

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Sección de Químicas.



TESIS DOCTORAL

Catabolismo auxínico en las raíces de los cereales

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María del Carmen Gómez-Cordovés de la Vega

Madrid, 2015

11 577.1

6017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322350761

Catabolismo Auxinico en las Raíces en los Cereales

Maria del Carmen Gómez-Cordovés de la Vega

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Sección de Químicas

CATABOLISMO AUXINICO EN LAS RAICES DE LOS CEREALES

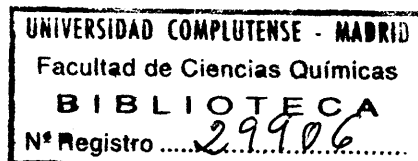
Tesis presentada para optar al grado de Doctor

por

Maria del Carmen Gómez-Cordovés de la Vega

Instituto de Fermentaciones Industriales del
Patronato de Investigación Científica y Técnica Juan de la Cierva del C.S.I.C.

Madrid, Junio de 1971



Mi agradecimiento a:

Dr. D. Manuel Lora Tamayo, ponente de esta Tesis.

Dr. D. José Luis García Bilbao, director de este trabajo.

Mis compañeros.

*Y al Instituto de Fermentaciones Industriales del Patronato
to Juan de la Cierwa, por las facilidades dadas para la
realización del mismo.*

Alfonso F. Rodríguez

INDICE

Páginas

Introducción	1
Estado Actual Del Problema	4
Mecanismos De Las Reacciones	9
Productos De Degradación	15
Complejo Enzimático	18
Inhibidores Naturales	20
Antioxidantes	21
Interacción GA ₃ /AIA	23

Materiales y Metodos

Tecnicas Generales	25
Materiales	26
Métodos	28

Parte Experimental

<i>Efectos De La Fitohormona y Algunos Compuestos Fenólicos</i>	
Sobre La Germinación Visible	33
Naturaleza De Los Extractos	38
Efecto De Dilución Del Extracto Crudo	39
Efecto Del pH	40
Complejo Enzimático Funcional	41
Cofactores	43
Activadores Metálicos	48
Acción De Otros Compuestos Fenólicos y Sustancias Relacionadas	49

	<u>Páginas</u>
Efectores Del Sistema HIA-Oxidasa	53
Compuestos reductores	56
Purificación Del Sistema Enzimático.	
Dialisis	59
Cromatografía	60
Fenoles Libres	63
Actividad Enzimática Del Apoenzima Purificado Cromatogra- ficamente	64
Cromatografía En Capa Fina De Los Cofactores Naturales ...	68
Aislamiento y Caracterización De Algunos Compuestos	
Naturales De Las Raíces	70
Aislamiento y caracterización de la escopoletina	76
Esteroides	80
Actividad Enzimática Del Apoenzima Purificado En Sephadex G-200	81
Influencia Del pH En La Actividad Del Apoenzima Purificado.	
pHs Optimos	85
Actividades HIAOxidasa y Peroxidasa: Paralelismo	89
Actividades Peroxidasicas y Catalasicas	93
Especificidad Del Sustrato	95
Actividad HIAOxidasa Observada Espectrofotometricamente .	99
Cinética De La Reacción Enzimática.	
Raíces troceadas	103
Extracto purificado en Sephadex G-50	105

	<u>Páginas</u>
<i>Destrucción Del AJA Por Irradiación Con Luz U.V.</i>	<i>110</i>
<i>Destrucción Del AJA Por Medio De La NBrSuccinimida</i>	<i>114</i>
<i>Destrucción Del AJA Por Acción Conjunta De Irradiación Con Luz U.V. y NBrSuccinimida</i>	<i>129</i>
<i>Efectos Del pHF y Del Ac. Giberélico</i>	<i>134</i>
<i>Interacción GA₃/AJA</i>	<i>142</i>
<i>Complejo Quinona/AJA</i>	
<i>Efectos de pH, polaridad y fuerza ionica</i>	<i>147</i>
<i>Competición</i>	<i>152</i>
<i>Complejo Pirogalol/Auxina</i>	
<i>Destrucción por acción enzimática</i>	<i>154</i>
<i>Discusión</i>	<i>157</i>
<i>Conclusiones</i>	<i>167</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>174</i>
<i>Bibliografía</i>	<i>180</i>

PARTE TEORICA

Catabolismo Ruxínico en las raíces de los cereales

Introducción

Durante el proceso del malteado normal el desarrollo de las raicillas está acompañado por un considerable transporte del material de reserva desde el endospermo al embrión, incorporando las raicillas aproximadamente un cinco por ciento del peso del grano; al mismo tiempo que el aumento de la actividad respiratoria ante los grandes requerimientos energéticos del crecimiento, consume otro tanto del material.

Las nuevas técnicas de malteado tratan de reducir este consumo controlando el crecimiento de las raicillas.

El estudio de las acciones fisiológicas de los ácidos fenólicos naturales en los granos de cereales, nos puso de manifiesto que los ácidos hidroxycinámicos actuaban a concentraciones del orden de 10^{-3} M como inhibidores de la germinación y algunos como inhibidores del crecimiento de la raíz.

Ya en 1959, Gortner y Kent habían observado la acción inhibidora de los ácidos cafeico, ferúlico y clorogénico, así como de la cumarina escopoletina sobre el sistema enzimático AIA-oxidasa (ácido indolacético-oxidasa).

Interesados por el problema, en nuestra sección de maltería iniciamos el estudio del sistema AIA-oxidasa en las raíces de los cereales en relación con la germinación visible -crecimiento- de las semillas, observada bajo la acción de los ácidos fenólicos,

que publicamos bajo el título "Destrucción oxidativa del ácido indol - 3-acético en las raíces de los cereales".

El crecimiento vegetativo se debe a un aumento irreversible en el tamaño de la plántula como resultado de la división y elongación celular, controladas por fitohormonas.

Durante mucho tiempo solo se conocía el ácido indol-3-ácetico (AIA) como unico factor ejerciendo control en el desarrollo y crecimiento de las plantas, aunque durante ese periodo se iban acumulando pruebas de que algunas de sus actividades fisiologicas dependían de la presencia simultanea de cantidades cataliticas de otros factores de crecimiento.

En nuestra publicación sobre el Crecimiento Vegetativo en los cereales se hace un breve estudio de las Fitohormonas -Auxinas Giberelinas y Cinesinas - como factores determinantes del crecimiento de las plantas. El AIA es aún considerada la principal Fitohormona en la regulación del crecimiento de las plantas y según su concentración puede exhibir comportamientos opuestos. En general, la raíz tolera concentraciones inferiores de la hormona que el tallo.

El mecanismo regulador de la concentración endogena y libre de la Fitohormona ante las exigencias fisiológicas del organismo vegetal nos lleva ante los dos problemas fundamentales:

El Anabolismo Auxinico, es decir, la biosintesis y el Catabolismo Auxinico, o biodegradación de estos compuestos, este último objeto de nuestro estudio.

Entre los enzimas responsables del catabolismo de las auxinas y ciertas hormonas vegetales, por ejemplo las Giberelinas existen toda una serie de relaciones.

Galston en 1957 observó que la cantidad de inhibidores del sistema HIA-oxidasa aumenta en los tejidos tratados con ácido giberélico (GA_3), atribuyendo a estos inhibidores de naturaleza fenólica la regla del tercer factor para explicar el mecanismo de interacción HIA/ GA_3 .

La modificación del catabolismo auxínico y por tanto del nivel endógeno de la Auxina no depende solamente de los enzimas sino de las actividades de los sistemas en donde gran número de factores ejercen sus acciones positivas y negativas.

El enzima específico responsable de la degradación de la fitohormona en los cereales no ha sido aislado, sin embargo como exponemos en la publicación "Agentes del Catabolismo Auxínico en los cereales" - se conoce la acción de las oxidasas y su intervención o participación en este fenómeno.

El Estado Actual Del Problema

Naturaleza de los agentes del catabolismo auxínico.

La destrucción o degradación de la Fitohormona AIA requiere oxígeno, siendo fuertemente disminuida cuando la tensión del oxígeno se debilita, e inhibida por los agentes que enmascaran los metales Fe y Cu, tales como cianuros, azidas, etc.

El aumento de la actividad AIA-oxidasa por el agua oxigenada, así como la inhibición competitiva por el guayacol - sustrato peroxidásico - parecían asegurar la participación de una peroxidasa en esta degradación y en 1953 galston y col. logran la oxidación del AIA por la peroxidasa cristalizada obtenida de raíces de rábano silvestre, sola o en presencia de agua oxigenada. Posteriormente, xenter (1955) nos muestra que el sistema AIA-oxidasa de las habichuelas está constituido por dos partes: una fracción termolabil, sustituible por la peroxidasa purificada y otra fracción termoestable que aumenta fuertemente la actividad de la precedente.

Los paralelismos encontrados entre las actividades AIA-oxidasa y peroxidásica empiezan a diverger en los trabajos de Pilet y Galston (1955) al comprobar que mientras la primera disminuye muy fuertemente desde la cofia hacia el meristemo de las raíces de lenteja su actividad peroxidásica aumenta muy debilmente.

En el curso de fraccionamiento de extractos enzimáticos sobre columnas de Sephadex, Sequeira y Illino (1966) han observado que las

fracciones con actividad HIA - oxidasa importante no están caracterizadas necesariamente por una fuerte actividad peroxidásica. Por otra parte varias perosidasas aisladas de un mismo vegetal muestran distintas actividades por la Fitohormona.

La hipótesis inicial, del trabajo de Galston y Baker de que la HIA - oxidasa era un complejo enzimático compuesto de una flavoproteína, que producía el agua oxigenada, y de una peroxidasa, que oxidaba la fitohormona con el agua oxigenada anteriormente producida, aunque explicaba el efecto inhibitor de Mn y el activador de la luz, no tuvo difusión al no identificarse el sustrato flavoproteínico, ni compuestos flavínicos. Las preparaciones crudas de HIA - oxidasa pueden ser activas por la luz y el espectro de acción de la luz se parece grandemente al espectro de absorción de la riboflavina. El Mn inhibe, descomponiendo el agua oxigenada que puede producirse por la acción de la luz sobre la flavoproteína.

La acción peroxigénica del HIA, experimentalmente demostrada por Andrae y Andrae, pone de manifiesto que las flavoproteínas no son componentes necesarios de los sistemas HIA - oxidasa a base de peroxidasa, pero no excluyen su cooperación "in vivo" o en los homogeneizados brutos.

Waygood, Oak y MacLachla (1956) han demostrado que la catalasa purificada puede catalizar la oxidación de HIA pero solamente en presencia simultánea de iones Mn^{2+} y de un monofenol. La resorcina o la hidrazida maléica en fuerte concentración pueden igualmente servir de cofactor. Los iones Mn^{3+} producidos por la catalasa pueden

ser los responsables de la degradación. Pero Gaspar y Dinant (1967) llegaron a la conclusión de que la catalasa no participaba directamente en la actividad AIA - oxidasa de los extractos vegetales, pues la concentración de Mn, del orden de $10^{-5}M$, en los extractos naturales de lentejas no es suficiente para que la catalasa destruya la Fitohormona.

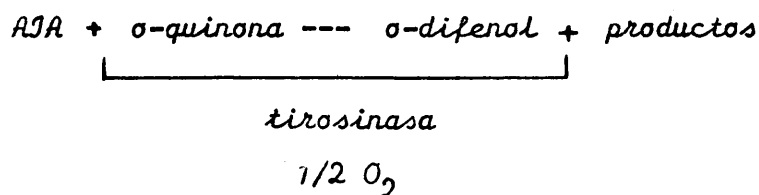
La participación directa o indirecta del Cu, elemento eminentemente oxidoreductor en múltiples reacciones enzimáticas, incluida la degradación oxidativa del AIA, parece ser natural. Después que Pongratz (1950) demostró que diversos agentes químicos capaces de formar complejos de adición con iones Cu^{2+} (p.e. piridina, imidazol, bases puricas y pirimidinicas) aumentan considerablemente el poder catalítico de oxidación del cobre, Turia (1957) ha estudiado la acción oxidásica y peroxidásica de las sales de cobre y de sus complejos de adición sobre el ácido β -indolacético. El AIA es rápidamente destruido "in vivo" por los complejos de ión cobre y de base nitrógenada como la piridina y el imidazol. Sin embargo Gortner y Kent (1958) no logran inhibir la actividad AIA - oxidasa de extractos de piña con venenos específicos de enzimas de cobre,.

Anteriormente, Fujiwara y Tsutsumi (1954) habían llegado a la conclusión que la AIA - oxidasa del trigo era una enzima cuprica cuya síntesis se aceleraba en presencia de molibdeno, ya que observaron que plantas de trigo cultivadas en condiciones deficientes en cobre o en molibdeno mostraban una actividad degradativa de

la Fitohormona muy debil, mientras que la deficiencia en Fe, Zn y Mn no mostraba efecto alguno. Pero, es conocido desde 1930 por Elvehjen que una deficiencia en cobre puede conducir a una deficiencia en enzimas ferricos tales como las citocromo-oxidasas.

Los extractos crudos de los tejidos vegetales manifiestan en general actividades peroxidasicas, catalasicas y polifenoloxidasicas (Brigg y col. 1955) y muestran una inhibición parcial de su actividad AJA - oxidasica por los agentes acomplejantes (quelatos) del cobre.

Ultimamente los trabajos de Brigg y Ray (1956) muestran de forma convincente que la polifenoloxidasa puede inactivar la Auxina oxidasicamente pero solo en presencia de pirocatequina o de pirogalol ($10^{-3}M$) y estos investigadores sugieren que la Fitohormona puede reaccionar con algún producto de oxidación del fenol.



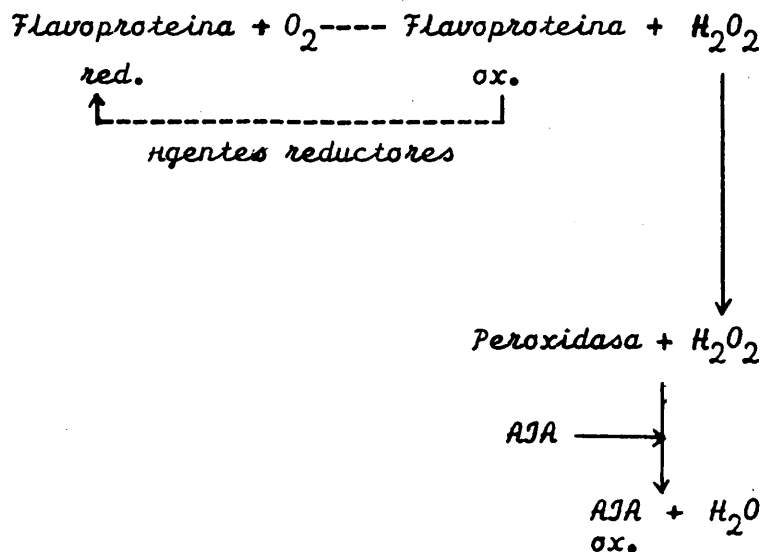
Según Tomaszewski (1959), el sistema ácido clorogenico/ fenolasa es responsable de la inactivación auxinica "in vivo" probablemente catalizando la formación de complejos fenol/ auxina. La existencia de tales complejos ha sido puesta de manifiesto por Leopoldo y Plummer (1961). Kónings (1964) establece la presencia de fenoloxidasa en los extractos de guisante comprobando la formación de un compuesto rojo en presencia de cátecol y de prolina (complejo quinona - aminoácido)

Bastin (1965), nota que aquellos complejos pueden ser igualmente formados durante la oxidación de los polifenoles por las peroxidases o por el hierro en el medio ácido de los reactivos colorimétricos del AIA. Gaspar (1965), después de un análisis espectrofotométrico relativo a la formación de complejos entre el AIA y los productos de oxidación de la pirocatequina, interpreta el fenómeno suponiendo que los productos de oxidación del polifenol, sucesivamente formados por la fenoloxidasas, tienen mayor o menor afinidad por la Fitohormona. Estos complejos que enmascaran el AIA por los métodos colorimétricos generales, pueden hacer creer en su destrucción real por los enzimas que catalizan la formación del complejo. La falta de actividad biológica de tales complejos podrá justificar eventualmente el término "inactivación" pero no en el sentido de una degradación de la fitohormona por las fenoloxidasas.

Se podrá proponer sin embargo, una participación indirecta de las fenoloxidasas en la degradación del AIA, ya que los inhibidores naturales del sistema AIA - oxidasas son generalmente los polifenoles.

Mecanismos de Las Reacciones

De acuerdo con la hipótesis inicial de trabajo, propuesta por Galston y Baker (1949 - 1953) el primer esquema enzimático correspondía a una peroxidasa que oxidaba al AIA mediante el agua oxigenada producida por un sistema flavoproteínico

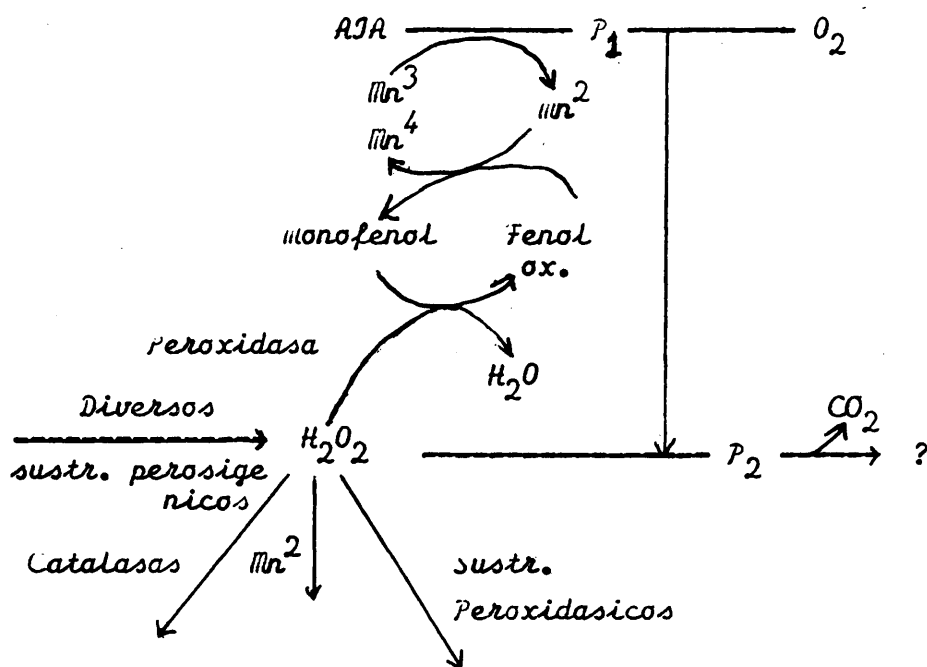


en donde el AIA puede ser el agente reductor de la flavoproteína oxidada.

Posteriormente, al comprobarse que la flavoproteína no era un componente obligatorio del sistema y que la peroxidasa sola podía destruir la Fitohormona se propusieron otros esquemas, como el de Kenten en 1955, basados en el poder oxidante de los iones mangánicos (Mn^{3+} y Mn^{4+})

El sistema responsable de la oxidación del Mn^{2+} estaba formado por un factor termolábil que puede ser reemplazado por la peroxidasa purificada y una fracción termoestable que

se suponía un sustrato peroxidásico, y de agua oxigenada (en trazas)



En donde se pueden ver los efectos del manganeso. Pues, en ciertas condiciones su activación es ostensible lo mismo que con ciertos sustratos peroxidásicos como los monofenoles y el resorcinol. Los polifenoles inhiben la degradación de la ritohormona.

Waygood y MacLachlan (1956, 1961), ante el estudio del modo de acción de diversas sustancias que afectaban a la oxidación del ácido indolacético propusieron una serie de reacciones más explícitas con intervención de radicales libres y formación de un peroxirradical. Estos esquemas permitían explicar el periodo de inducción, como el tiempo requerido para que la cantidad de Mn^{3+} sea suficiente para desencadenar la reacción, así como el periodo de latencia impuesto por diversos inhibidores que debían ser destruidos con anterioridad.

La sustitución del agua oxigenada por un peróxido de indol (endógeno) explica mejor la oxidación de la Fitohormona por la peroxidasa sola.



Sin embargo, en estos sistemas de reacciones la intervención enzimática en la oxidación de la Fitohormona es indirecta, basándose principalmente en el poder oxidante del Mn^{3+} .

Ray y Thimann (1955, 1956) introducen nuevas concepciones del proceso oxidativo y del modo de acción de los polifenoles como inhibidores.

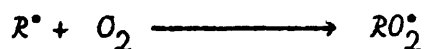
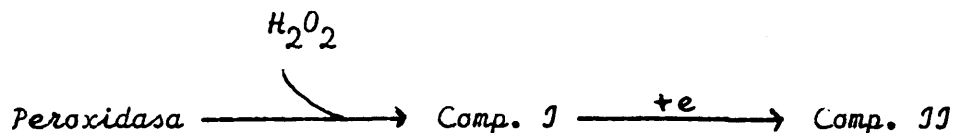
Ray (1960) demuestra que el AIA no es destruido por una simple peroxidación y que el oxígeno interviene de una manera más directa (oxidación). El enzima puede comportarse a la vez como la peroxidasa y como oxidasa, actividades que él atribuye a diferentes formas del mismo enzima.

Los polifenoles obrarán como antioxidantes, combinándose con los radicales libres liberados en los procesos oxidativos.

Yamasaki y Souza en 1960 descubren espectrofotométricamente la aparición y desaparición de complejos entre la peroxidasa y el H_2O_2 y ponen de manifiesto la aparición de radicales libres con la ayuda de un espectrofotómetro de resonancia paramagnética.

Ray en 1962 reconsiderando los diversos mecanismos propuestos para explicar las reacciones de oxidación por la peroxidasa, propone el

esquema siguiente:



en donde R^\bullet es un radical libre del AIA y RO_2H un hidroperoxido inestable.

Con respecto a los monofenoles:

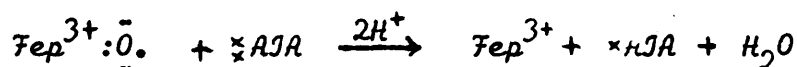
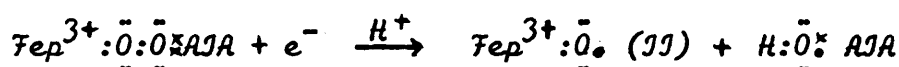
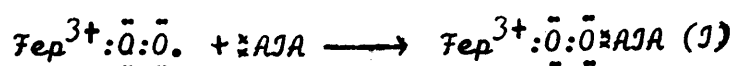
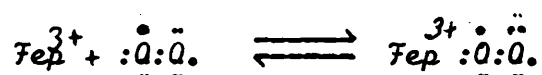


siendo estos dos procesos más rápidos que la reacción (1) y por tanto explican la activación del proceso por los monofenoles.

La destrucción de AIA puede seguir mecanismos diferentes según las condiciones de las reacciones por ello solamente exponemos los probables caminos en las condiciones fisiológicas de germinación.

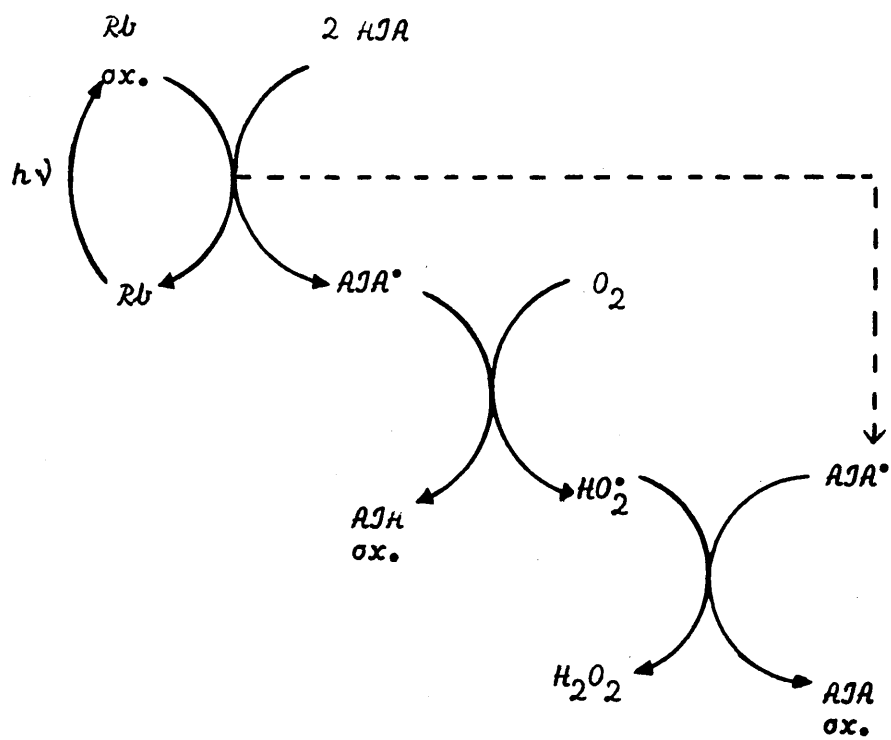
Hayaishi (1962) denomina oxigenasas a las enzimas que catalizan la fijación del oxígeno molecular sobre un sustrato.

Finalmente, Fox y col. (1965) observan la necesidad absoluta del oxígeno, la presencia y formación de radicales libres, la aparición de los compuestos intermediarios I y II, sin que puedan poner en evidencia H_2O_2 endógena. Por ello proponen que los compuestos I y II no son el resultado de una interacción entre la peroxidasa y el H_2O_2 formada, sino la consecuencia de una interacción entre la peroxidasa y la Fitohormona, según el siguiente esquema:



Las estructuras sugeridas para los compuestos I y II son electrónicamente idénticas a las propuestas por Theorell y col. formadas a partir de simples peróxidos. Estas reacciones explican a la vez la necesidad de oxígeno y de radicales libres.

La destrucción del AJA por irradiación con luz U. V. en presencia de la riboflavina (Rb) se produce igualmente mediante un mecanismo en donde intervienen los radicales libres (Bastin, 1966) p.e.



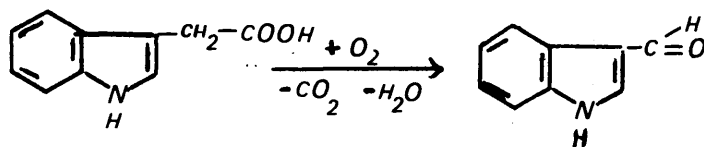
Productos De La Degradación

Examinando los diversos compuestos indólicos que han sido aislados de los extractos vegetales se puede apreciar una gran variedad y paralelamente señalar que no todos se encuentran necesariamente en las mismas especies. Lógicamente, entre estas sustancias indólicas algunas deberán tener relación con el Catabolismo Auxínico.

Si la presencia de β -indolaldehído en las soluciones tratadas por extractos auxin - oxidasas, indicaba ataque a la cadena lateral de la fitohormona Manning y Galston (1955) por otra parte y mediante análisis cromatográfico de los productos, muestran que el anillo indol puede ser el primer punto de ataque de la oxidación.

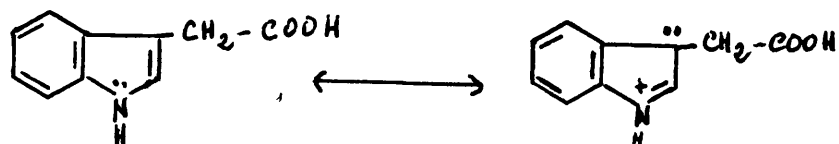
Las vías de degradación del AIA no son pues necesariamente idénticas de una especie vegetal a otra, y las características cinéticas de los sistemas enzimáticos reaccionantes son igualmente diferentes. Por consiguiente está claro que los complejos enzimáticos responsables de la degradación de la Fitohormona no son necesariamente los mismos y por ello no es posible dar un solo mecanismo que satisfaga y justifique todos los compuestos derivados.

Así el esquema inicial propuesto para explicar la aparición del β -indolaldehído

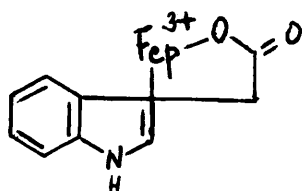


evoluciona a los posteriores ciclos con intervención de los radicales libres.

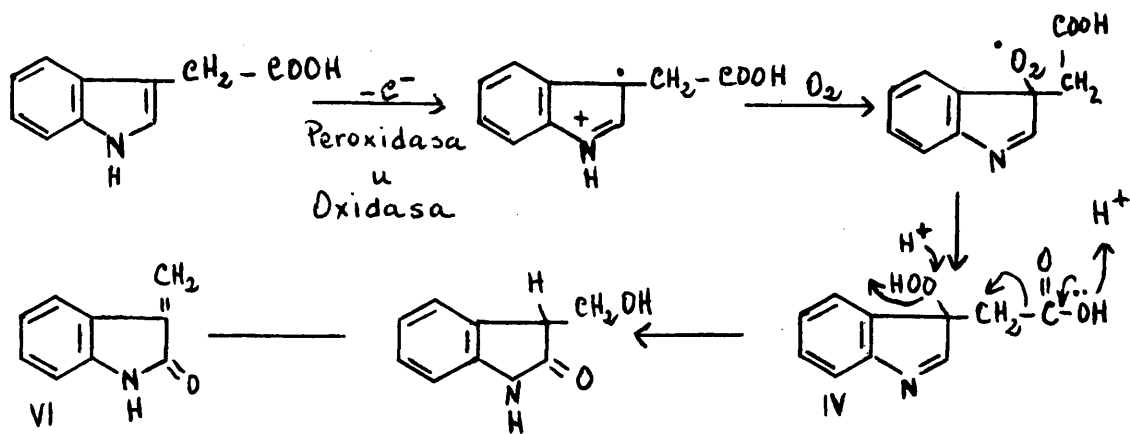
La naturaleza nucleofila del AIA existirá en equilibrio



La primera etapa del ataque de la Fitohormona es generalmente la pérdida de un electrón del núcleo indol y la toma de oxígeno puede tener lugar mientras que el radical de la Fitohormona está aún ligado al enzima.

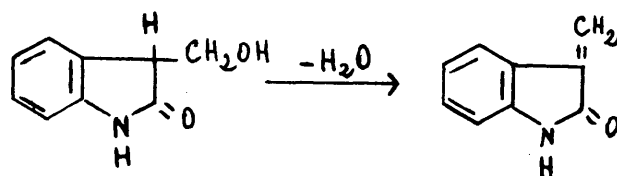


Luego, el radical de AIA producido podrá por un mecanismo auto catalítico de radicales libres realizar la serie de reacciones pro puestas por Hirman y Lang (1965) e incluso otras.



explicando la conversión del ácido indolacético en metilenoindol(VI)

El hidropérido (IV) se transforma probablemente en el oxindol-3-carbinol a través del epóxido. El 3-metilenoindol (VI) presenta bandas de absorción características en las longitudes de onda 247 y 253 m μ . De manera semejante, Fukuyama y Moyed, analizando los productos de fotoxidación del AIA catalizado por riboflavina caracterizaron al 3-hidroximetiloxindol y al 3-metilenoindol típico



a quienes atribuyen más que al ácido, las propiedades inhibitorias en crecimiento y germinación. Ambos compuestos se transforman en 3-metiloxindol sustancia no tóxica para los microorganismos.

Complejo Enzimático

El sustrato y el enzima constituyen el conjunto funcional mínimo, modificando la actividad diversos compuestos o "efectores". En ocasiones, algunos efectores que en general aumentan la actividad enzimática (óptima en determinadas condiciones) y que por ello se consideran de efectos positivos, pueden, en condiciones extremas - por ejemplo alta concentración - disminuir e incluso paralizar la reacción y tener, por tanto, efectos negativos. Los efectos negativos de la reacción podrán actuar competitivamente o no.

Los efectores elaborados "in vivo" (endógenos) por el organismo vegetal tienen mayor importancia; sin embargo en la investigación experimental se prueban otras sustancias que no existen necesariamente en los tejidos vegetales (sustancias exógenas) pero que por tener estructuras o grupos activos semejantes a los efectores nativos tienen alguna acción sobre el sistema.

Muchas son las sustancias ensayadas con los sistemas de los extractos - crudos ó purificados - de gran número de tejidos vegetales capaces de degradar la fitohormona.

Factores fisico-químicos: luz.

Además de los factores fisico-químicos generales en todo proceso enzimático, como concentración, pH, temperatura, en este sistema específico de la degradación de la fitohormona, por realizarse a través de un mecanismo de radicales libres, el concurso de la luz tiene gran importancia.

Bajo la acción de la luz, la riboflavina sola - como recepto-

ra de la energia luminosa - puede degradar el ácido in:ol-3-acético

Inhibidores Naturales

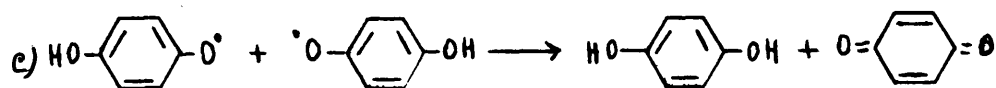
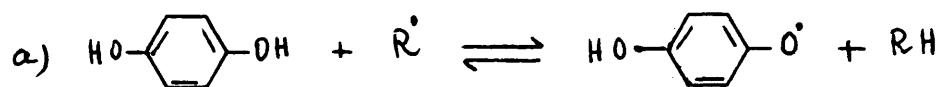
En la observación directa de las fracciones ácidas obtenidas de las raíces de cebada y avena germinadas en condiciones normales, se aprecia claramente la gran diferencia en compuestos fenólicos fluorescentes a favor de los extractos de raíces de avena. Sin duda las raíces de avena común contienen una gran proporción de estos compuestos, en particular ac. ferúlico y escopoletina inhibidores del catabolismo auxínico, entre otras funciones.

Se ha aislado y caracterizado el ac. ferúlico y la escopoletina; esta última había sido aislada con anterioridad por Goodwin y Flock, de avena silvestre.

Antioxidantes

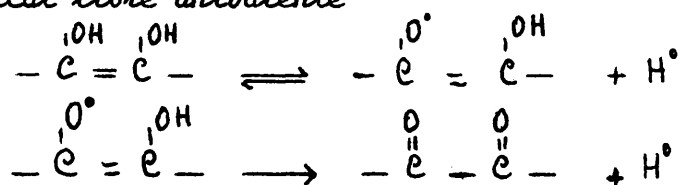
Entre los efectores negativos o inhibidores de la oxidación, aquellos que inhiben o retardan la degradación de la fitohormona mediante un mecanismo de radicales libres se denominan antioxidantes.

El posible mecanismo antioxidante de los difenoles capaces de oxidarse a estructuras quinónicas, se puede representar en las siguientes reacciones:



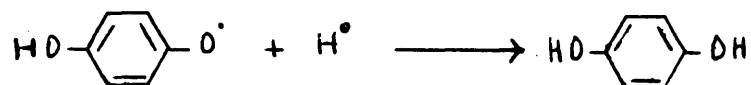
En las reacciones a y b se indica que el antioxidante provee de átomos de hidrógeno, paralizando el mecanismo de Iniciación y Propagación de la oxidación, a través de los radicales libres.

El ácido ascórbico, igualmente, se oxida mediante un mecanismo de radical libre univalente



y actúa como antioxidante.

Cuando se usa con antioxidantes fenólicos - más potentes - refuerza marcadamente la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos con una acción sinérgica, proveyendo de átomos de hidrógeno a los radicales de semiquinona



y regenerando el antioxidante.

Los potenciales de oxidación de los sistemas considerados están en el orden:

peróxido > quinol > ácido ascórbico

Los ácidos cítrico, tartárico, galacturónico y fosfórico son compuestos sinérgicos y tienen también alguna acción de quelación sobre los metales catalíticos.

Otros inhibidores.

En general la velocidad de oxidación puede disminuirse considerablemente por acción de ciertos agentes que enmascaran los metales prooxidantes formando quelatos. y como la oxidación es autocatalizada por los hidropéroxidos formados, los agentes reductores como el sulfito, al destruir los peróxidos disminuyen la reacción.

Interacción GA_3 /AIA

Las giberelinas en general, moderan considerablemente la destrucción "in vitro" de la fitohormona por los extractos enzimáticos.

Galston (1957), observa que la degradación del AIA por extractos enzimáticos procedentes de tejidos tratados con ácido giberelico es fuertemente disminuida aumentando la cantidad de inhibidores del sistema; por ello, como ya hemos indicado anteriormente Galston y Warburg (1959) atribuyen a estos inhibidores del sistema AIA-oxidasa la regla del tercer factor, como efectores negativos, para explicar el mecanismo de la interacción GA_3 /AIA.

Los efectores de naturaleza fenólica adquieren una gran importancia, siendo controlada su oxidación a sustancias polifenólicas inhibidoras por la giberelina y la luz.

Está probada la acción indirecta del ácido giberelico sobre la actividad AIA-oxidasa, al controlar el balance de efectores positivos y negativos, e incluso puede ser posible una acción directa sobre el catabolismo auxínico.

Mac Cune y Galston (1959) revisando sus propios experimentos observan que el tratamiento con GA_3 aumenta la velocidad de crecimiento y modifica la especificidad de la actividad peroxidásica, mostrando menor actividad frente al pirogalol pero mayor frente al guayacol.

¿Es posible que el GA_3 pueda modificar la afinidad de las peroxidasas hacia la Fitohormona?

MATERIALES Y METODOS

Técnicas Generales

Actividad enzimática

Termoestato Belenquer tipo T

Colorímetros:

Colorimeter Beckman

Spectronic 20

Respiración

Warburg Kobold

Espectros ultravioletas

Spektralfotometer DU. Beckman modelo G 2400

Espectros infrarrojos

Grating Infrared Spectrophotometer 257. Perkin-Elmer

Rotación específica

Polarimeter 141. Perkin-Elmer

Materiales y Métodos

Materiales.

Granos de cebada cervecera y de avena común recolectados en Castilla durante las últimas campañas, seleccionados y esterilizados.

Raíces.

Las semillas germinan asepticamente en cajas/Petri, esterilizadas en autoclave, con tierra de infusorios calcinada o papel, como soporte acuoso.

Con el fin de evitar la sensibilidad al agua de las semillas, se adiciona diariamente agua destilada hasta alcanzar el límite de retención del soporte.

La germinación efectuada a la temperatura ambiente (18-21°C) y en la oscuridad, se interrumpe cuando las raíces alcanzan una longitud media de 1,5 a 2 cm. y se cortan.

Extracto enzimático crudo.

En general, para la obtención del extracto enzimático crudo se trituran 2 grs. de raíces frescas del cereal y se recogen en 10 ml. de agua destilada o solución tamponada.

Mediante centrifugación a 3000 r.p.m. durante 15 minutos se separa el sobrenadante que contiene la preparación enzimática. En alguna ocasión se obtuvo por filtración.

Purificación de la preparación enzimática.

a) Tratamiento con agua oxigenada.

Para la destrucción de los compuestos fenólicos, el extracto

crudo se puede tratar con agua oxigenada (1 ml. 0,1 N en 10 ml. de medio). La eliminación del agua oxigenada por acción conjunta de peroxidasas y catalasas es rápida, pero para mayor seguridad se mantiene toda la noche en nevera o se adiciona una gota de solución de permanganato diluido (0,01 N).

b) Tratamiento con carbón activo.

El extracto crudo tratado con 0,1 gr. de carbón activo mediante agitación durante 5 minutos, se filtra a través de papel Albert nº 242 para eliminar completamente el carbón. Mediante este tratamiento de separación de compuestos macromoleculares y poco disociados se prepara el apoenzima del sistema, libre de efectores fenólicos.

c) Elución a través de la columna de Sephadex.

El excelente resultado del polidextrano Sephadex en la separación de compuestos según su tamaño molecular nos indicó que este material podía ser útil en la separación del enzima, de sus cofactores. Así, por elución a través de columna cargada de Sephadex, separamos la fracción proteica -apoenzima- de los demás componentes del extracto.

Métodos

Esterilización.

Los granos de cereales se esterilizan por inmersión durante 20 minutos en solución al 0,5 % aproximadamente, de hipoclorito sódico (ClO^-Na) recién preparada, a partir de $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ y Na_2CO_3 y acidulada con HCl hasta pH 6,0. Los recipientes de vidrio para la germinación se esterilizan en autoclave.

Actividad indol-3-acético oxidasa.

Se determina midiendo colorimetricamente la cantidad de Fito-hormona remanente en el medio, mediante el reactivo de Salkowsky después de doce minutos de reacción en un colorímetro a 535 m μ . Los valores se representan en % de AIA destruido, en las tablas, y en las graficas se mantiene la lectura directa de la densidad optica (D.O.) frente a tiempo.

La destrucción oxidativa del AIA se verifica en tubos anchos (2,5 cm. de diametro), con agitación esporádica a la temperatura de 30°C y en un volumen total de 6 ml. de mezcla, generalmente a pH=5,6, utilizando solución tamponada de fosfatos de 22 mM. Las muestras de 1 ml., a distintos tiempos, 5, 10, 30 y 60 minutos, se vierte rapidamente sobre el reactivo (8 ml. de reactivo Salkowsky más 1 ml. de alcohol etílico) agitándolo a continuación.

El reactivo Salkowsky utilizado se preparó con 3 ml. de solución de cloruro ferrico (40,5 grs./100 ml. de agua destilada), 100 ml. de agua destilada y 60 ml. de ácido sulfurico concentrado.

Actividades peroxidásica y catalásica.

Actividad peroxidásica.

Las peroxidasas catalizan la oxidación por peroxidos, de una gran variedad de sustancias, muchas de las cuales tienen fuertes bandas de absorción por si mismas o por sus productos de oxidación

a) Peroxidasa: Extracto natural de raices de cereal.

Sustrato: guayacol

La prueba con guayacol se basa en la medida de la velocidad de

utilización del peróxido para formar el producto coloreado de la reacción, determinado por medida espectrofotométrica. Se midió de acuerdo con el esquema siguiente:

3 ml. extracto crudo

0,1 ml. guayacol de 20 mM.

1 ml. agua oxigenada 0,38 M.

3,8 ml. fosfato monopotásico 0,02 M

Las medidas se realizaron en un colorímetro a 470 m μ .

b) Peroxidasa: extractos de raíz purificados en Sephadex G-50 y después en Sephadex G-200.

Sustrato: pirogalol

su determinación se basa en la formación de purpurogalina a partir del pirogalol por el método de Willstätter y Stoll con arreglo al esquema siguiente:

1,25 grs. pirogalol en 500 ml. (20 mM)

0,2 ml. agua oxigenada; 12,5 mgrs. en 500 ml. (0,74 mM)

500 ml. tampón fosfato pH = 7 11 mM

Se inicia la reacción con 1 ml. de problema y se paraliza agregando 5 ml. de ac. sulfúrico 5N. Se extrae con éter sulfúrico y se enrasa a 25 ml. midiéndose después a 430 m μ .

Las pruebas se hicieron dividiendo los 500 ml. en fracciones de 50 ml. y agregando 1 ml. de muestra problema a cada uno.

Actividad catalásica.

La determinación se efectúa por medida de la desaparición del peróxido por medio de la valoración con permanganato.

En un erlenmeyer de 50 ml. se introducen: 1 ml. de agua oxigenada 0,1 N; 10 ml. de tampón fosfato pH = 6,8 22mM. El tiempo cero se toma al incorporar 1 ml. de extracto crudo. Se toman muestras de 2 ml. y se llevan sobre tubos anchos conteniendo 2 ml. de ac. sulfúrico al 2% . Se valoran a los 20 minutos con permanganato 0, 01 N.

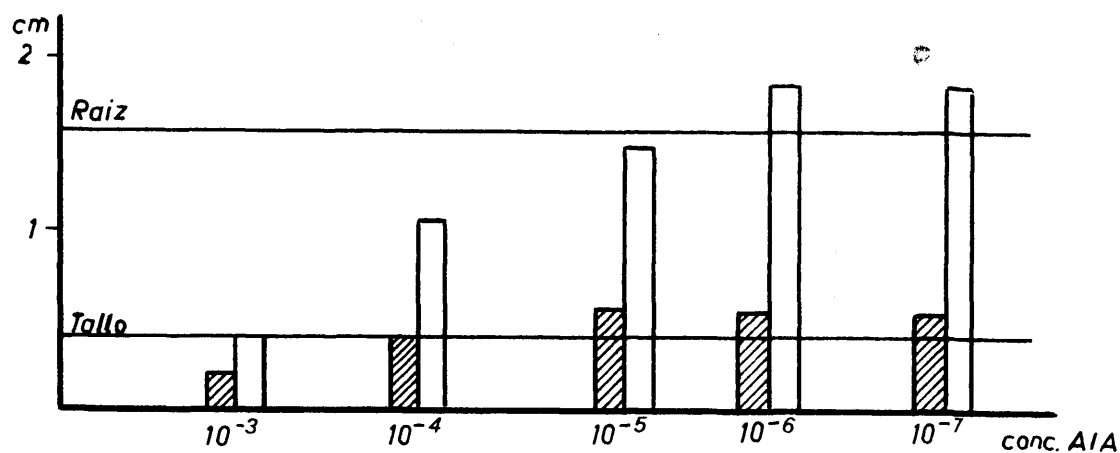
PARTE EXPERIMENTAL

Efectos De La Fitohormona y De Algunos Compuestos Fenólicos
sobre La Germinación Visible

La germinación se llevó a cabo con 25 granos o medios granos de cereal en cajas/Petri pequeñas, sobre papel con un volumen total de 4 ml. de la solución, (excepto para la avena con casacarilla, que se utilizaron 2 ml.) en tampón fosfato a pH=6,8, del compuesto cuyo efecto se quería comprobar.

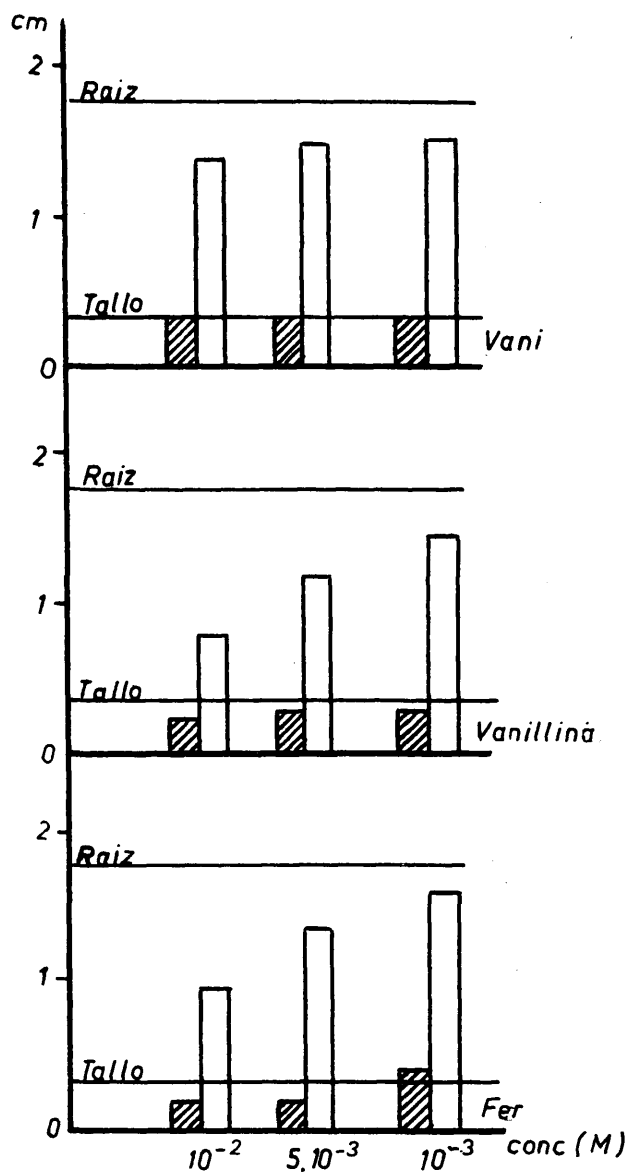
a) *Distinta* tolerancia de la Fitohormona por el tallo y la raíz.

		Cebada (medios granos)				
	Control	AIA				
		$10^{-3}M$	$10^{-4}M$	$10^{-5}M$	$10^{-6}M$	$10^{-7}M$
R cm	1,6	0,4	1,1	1,5	1,8	1,8
T cm	0,4	0,2	0,4	0,6	0,6	0,6



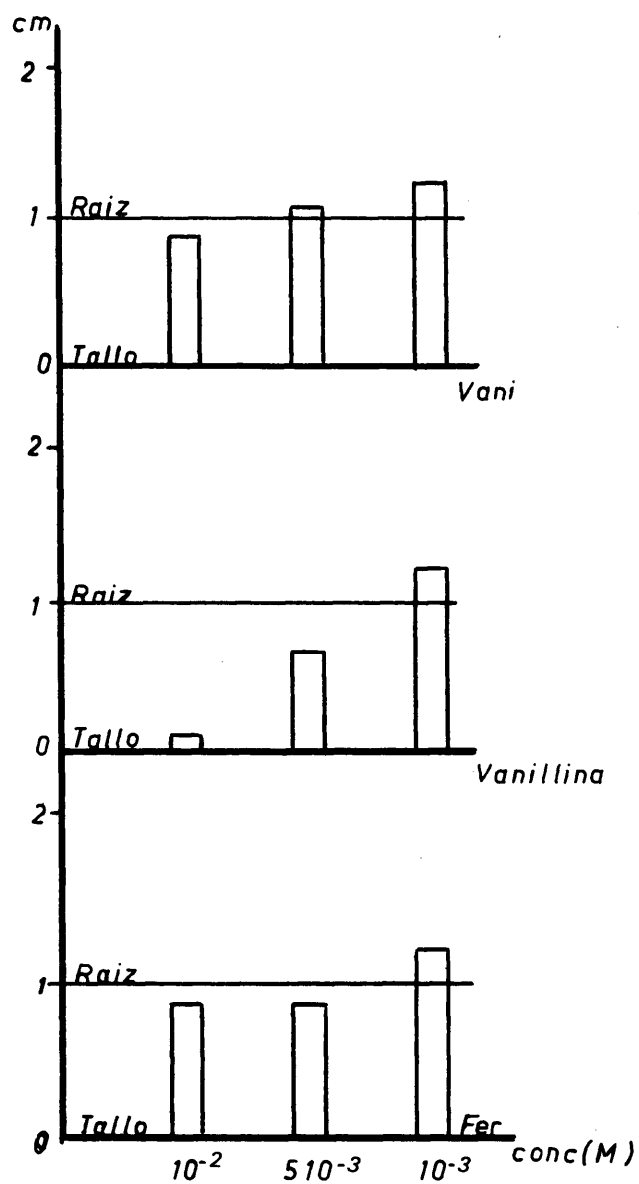
b) Acción de algunos compuestos fenólicos sobre la germinación.

Cebada (medios granos)



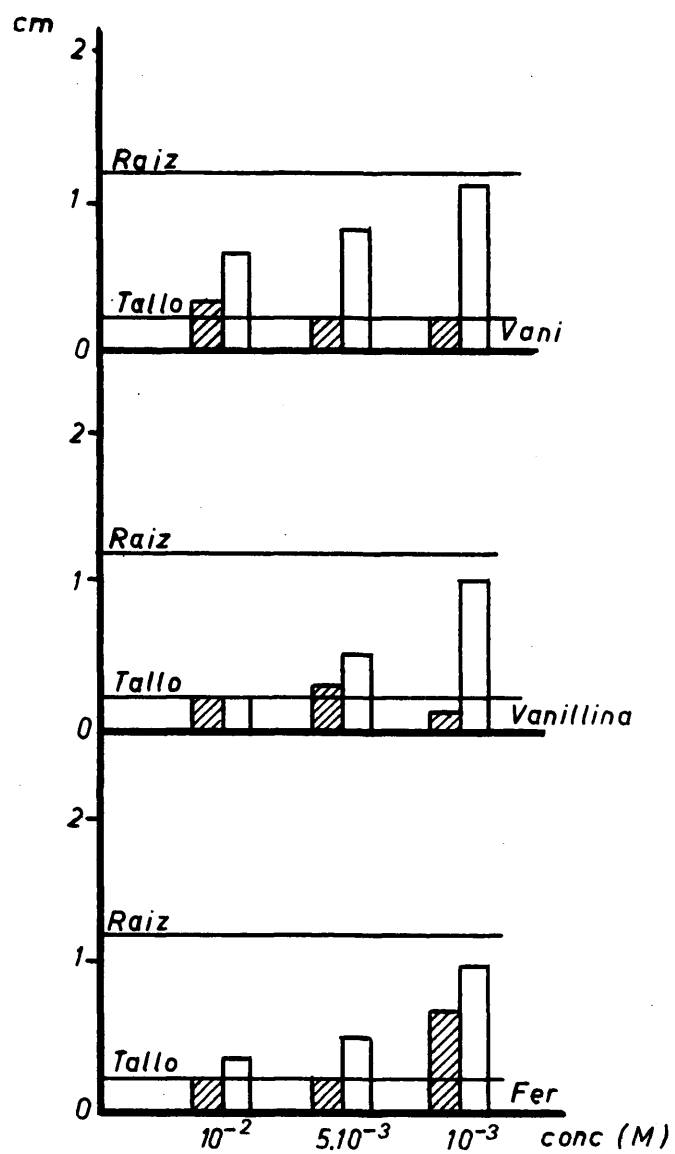
Conc	$10^{-2}M$	$5.10^{-3}M$	$10^{-3}M$	Control
Vanillinico				
R	1,4	1,5	1,6	1,8
T	0,35	0,35	0,35	0,35
Vanillina				
R	0,8	1,2	1,5	1,8
T	0,2	0,3	0,3	0,35
Ferúlico				
R	1	1,4	1,7	1,8
T	0,2	0,2	0,4	0,35

Cebada entera



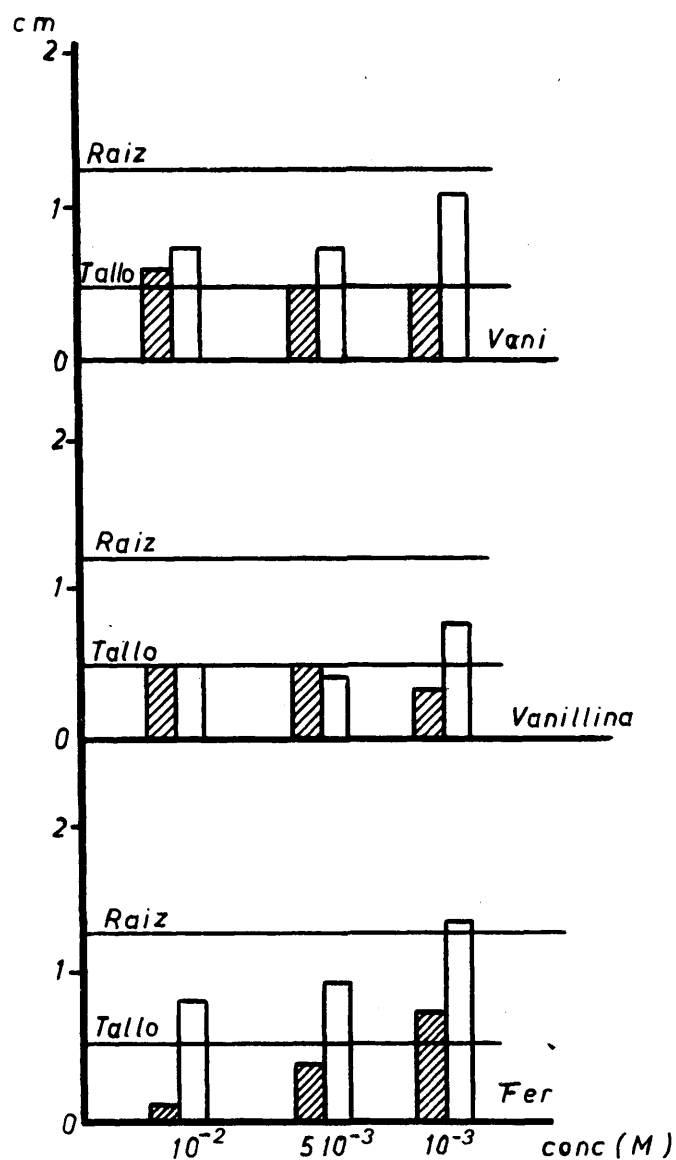
Conc molar	10^{-2}	$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	Control
Vanillinico				
R	0,85	1	1,2	1
T	0	0	0	0
Vanillina				
R	inic	0,6	1,2	1
T	0	0	0	0
Ferulico				
R	0,8	0,8	1,2	1
T	0	0	0	0

Avena pelada



Conc	10 ⁻²	5.10 ⁻³	10 ⁻³	Control
	Vanillinico			
R	0,6	0,8	1,1	1,2
T	0,3	0,2	0,2	0,2
	Vanillina			
R	0,2	0,5	1	1,2
T	0,2	0,3	0,1	0,2
	Ferulico			
R	0,3	0,5	1	1,2
T	0,2	0,2	0,65	0,2

Avena con casacarilla



Conc	10^{-2} molar	$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-3}	Control
Vanillinico				
R	0,7	0,7	1,1	1,25
T	0,6	0,5	0,5	0,5
Vanillina				
R	0,5	0,4	0,8	1,25
T	0,5	0,5	0,3	0,5
Ferulico				
R	0,8	0,9	1,3	1,25
T	inic	0,4	0,7	0,5

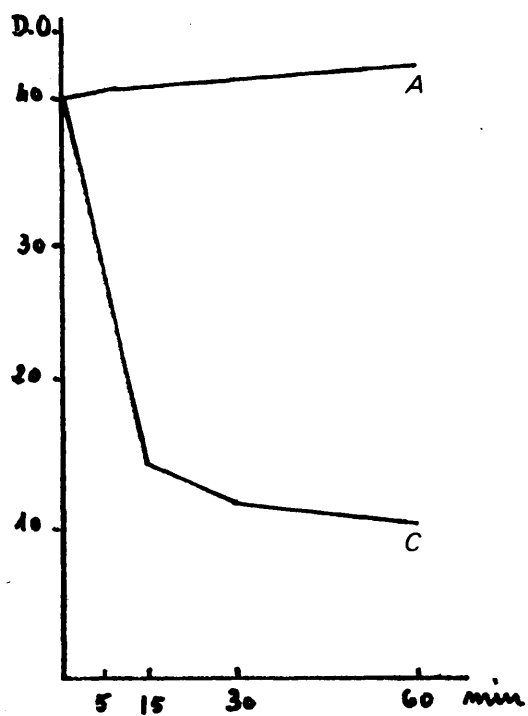
El volumen total de cada ensayo es de 2 ml. de solución.

Naturaleza De Los extractos

Los extractos enzimáticos crudos de las raíces de avena no exhiben actividad en tanto que los extractos concentrados de cebada muestran cierto periodo de inducción.

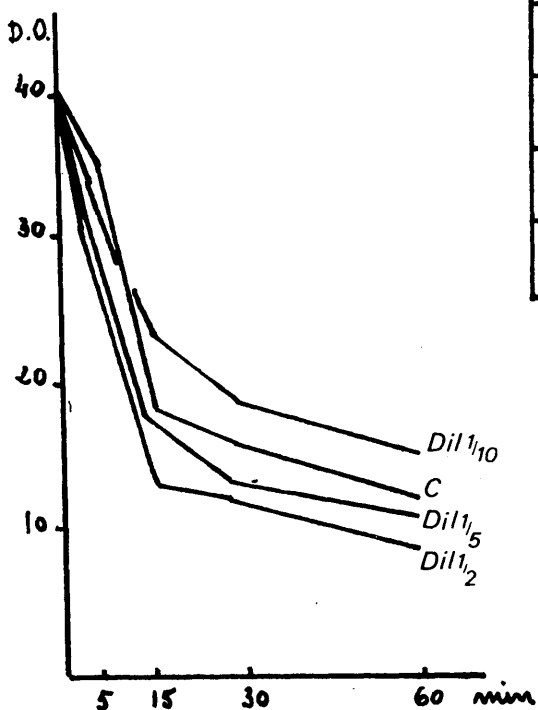
Esquema experimental		
	A	C
extracto	3 ml	3 ml
tampon pH= 5,6	1,5 „	1,5 „
A/A 200 μ /ml	1,5 „	1,5 „

Tiempo min	D.O. $\times 100$	
	A	C
5	40 ₅	34
15	41	15
30	41 ₅	12 ₅
60	42	11



Efecto De Dilución Del extracto Crudo

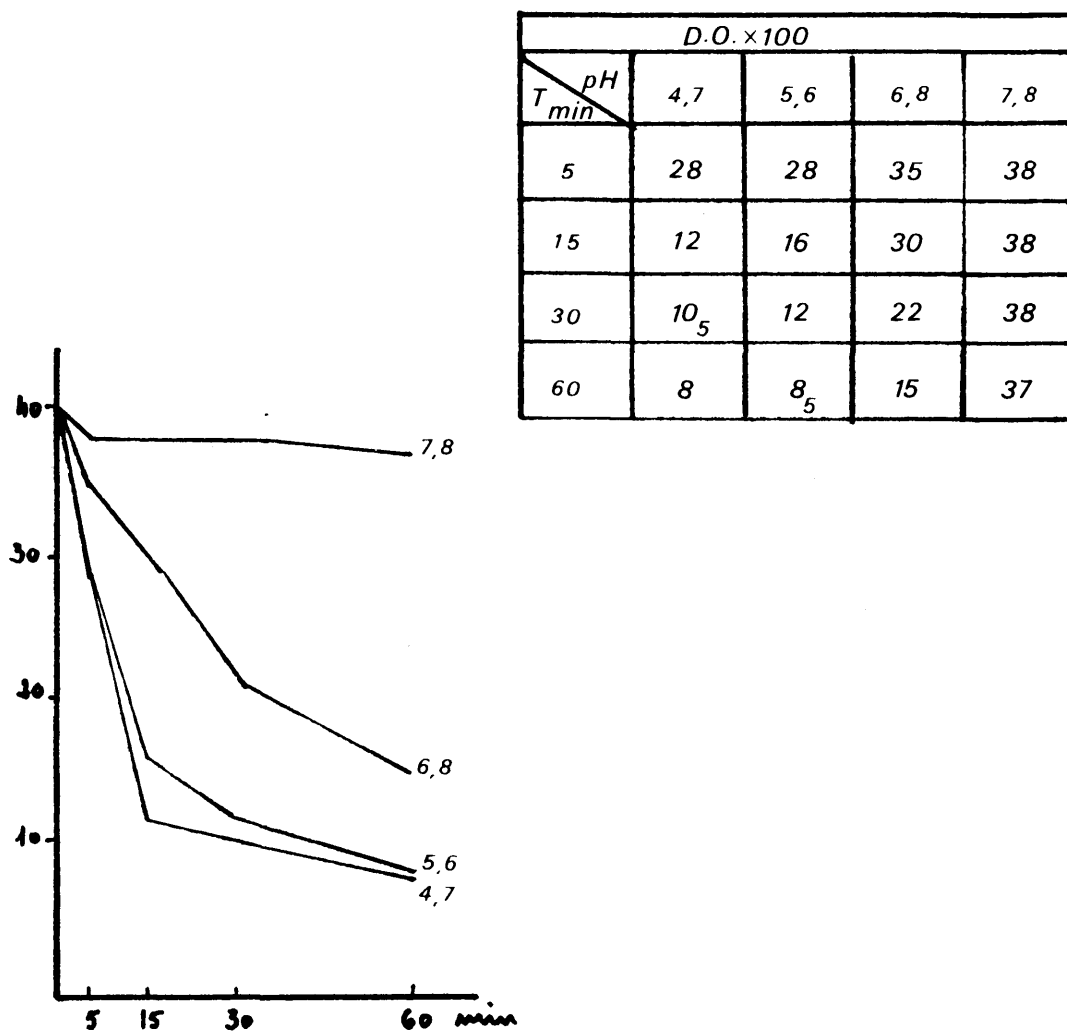
Los extractos diluidos a la mitad muestran mayor actividad que los concentrados; una mayor dilución disminuye la actividad por efecto de dilución del enzima. El esquema experimental es similar al anterior sin otra variación que la relativa a la concentración del extracto.



Tiempo	D.O. x 100			
	Con	Dil $\frac{1}{2}$	Dil $\frac{1}{5}$	Dil $\frac{1}{10}$
5	36	28	29 ₅	32
15	18 ₅	13 ₅	18	24
30	16	12	13 ₅	18 ₅
60	12	8 ₅	11	15

Efectos del pH

Los extractos muestran mayor actividad enzimática a pHs de germinación ácidos, inhibiendo los básicos. El esquema experimental similar a los anteriores con la única variación del pH del tampón.



Complejo Enzimático Funcional

Purificación de la preparación enzimática.

Evidencia de cofactores termoestables. Su naturaleza y eliminación.

- a) Tratamiento con agua oxigenada.
- b) Tratamiento con carbón activo.
- c) Tratamiento con calor.

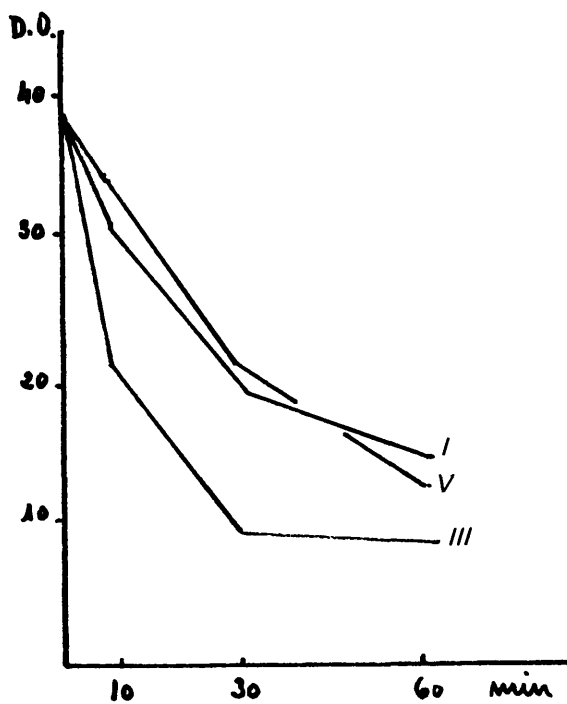
Esquema experimental					
	I	II	III	IV	V
extracto	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
tampon pH _{5,6}	2,5,,	2 25,,	2,5,,	2,5,,	1,5,,
ext hervido					1,,
MnO ₄ K 0,01M		5 gotas			
AIA 200r/ml	1,5,,	1,5,,	1,5,,	1,5,,	1,5,,

*aproximadamente 0,25 ml.

% AIA destruido					
T minutos	I	II	III	IV	V
10	30	37,5	44	2,5	12,5
30	55	55	61,5	0	44,5
60	66,5	67	85	0	67,5

Los extractos de las muestras I y II se trataron previamente con 1 ml. de agua oxigenada 0,1 M y se mantuvieron en nevera 16 horas. El extracto de III es natural y los de IV y V, tratado con carbón activo.

D.O. $\times 100$			
T minutos	I	III	V
10	30	20	33
30	20	10	21
60	15 ₅	9 ₅	12 ₃



Cofactores

a) Requerimiento de cofactores fenólicos y activadores metálicos termoestables.

Para el estudio de los cofactores se han fijado condiciones standard de trabajo propuestas en los esquemas siguientes.

Raíz de cebada.

Esquema experimental				
	I	II	III	IV
extracto	2 ml			
extr + C *		2 ml	2 ml	2 ml
tampon pH 5,6	2,5	2		
Mn^{2+} $5 \cdot 10^{-3} M$		0,5		0,5
pHC $5 \cdot 10^{-4} M$			2,5	2
AIA 200 γ /ml	1,5	1,5	1,5	1,5

* Extr + C significa extracto tratado con carbón activo.

% AIA destruido				
T minutos	I	II	III	IV
10	44	5	10	27,5
30	61,5	2,5	9	53

Raiz de avena

Esquema experimental					
	I	II	III	IV	V
extracto	2 ml	2 ml			
extr + C			2 ml	2 ml	2 ml
tampon pH 5,6	2,5	1,5	2		
$Mn^{2+} 5 \cdot 10^{-3} M$			0,5	0,5	
pHC $5 \cdot 10^{-4} M$		1		2	2,5
AIA 200 μ /ml	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

% AIA destruido					
minutos	I	II	III	IV	V
10	0	37	2,5	17,5	7,5
30	0	64,5	0	35	5,5
60	1	85,5	1,5	61	12

raiz de avena

el extracto + H_2O_2 ha sido tratado con 1 ml. de H_2O_2 0,1 M y
mantenido durante 16 horas en nevera.

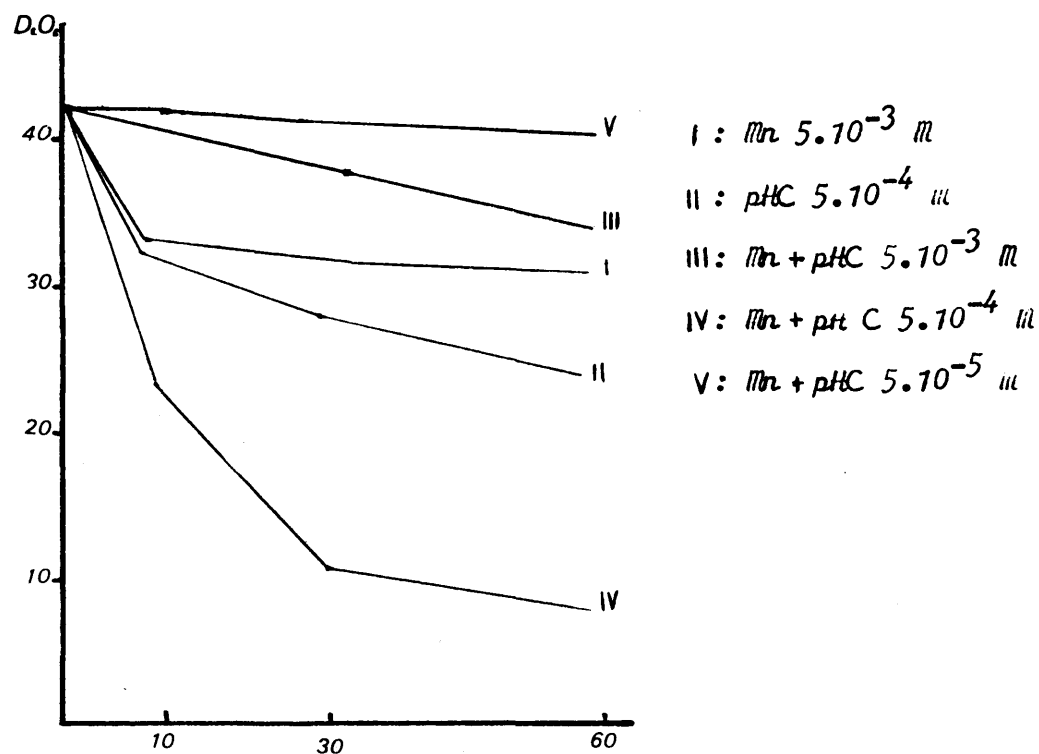
Esquema experimental		
	I	II
extr + H_2O_2	2 ml	2 ml
tampon pH 5,6	1	2
Mn^{2+} $5 \cdot 10^{-3} M$	0,5	0,5
pHC $5 \cdot 10^{-4} M$	1	
AIA 200 γ/ml	1,5	1,5

% AIA destruido		
minutos	I	II
10	32,5	12,5
30	65	19,5
60	84	30

Cofactores fenólicos

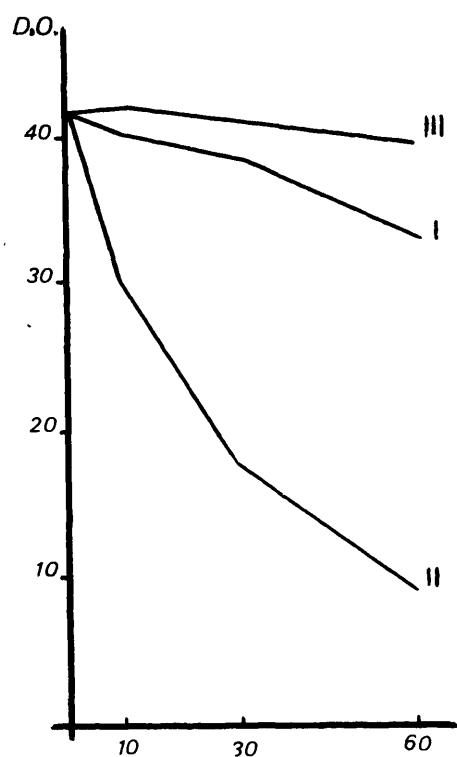
El apoenzima solo, tienen alguna actividad que se refuerza considerablemente mediante el complemento de cofactores fenólicos a concentraciones adecuadas.

Extr C.R. Cebada



D.O. x 100					
minutos	I	II	III	IV	V
10	34	33 ₅	41	24	4
30	33	28 ₅	39	10	41 ₅
60	32 ₅	25	35	7	41

Extr + C_R. Avena



I : Mn + pHC $5 \cdot 10^{-3}$ III
 II : Mn + pHC $5 \cdot 10^{-4}$ III
 III : Mn + pHC $5 \cdot 10^{-5}$ m

D.O. $\times 100$			
minutos	I	II	III
10	40 ₅	30	42
30	38 ₈	18	41
60	33 ₅	9	40

Activadores Metálicos

% AIA destruido									
Activadores $5 \cdot 10^{-3} M$	Extr + C R. Cebada			Extr + C R. Avena			Extr R. Cebada		
$Mn^{2+} \quad 5 \cdot 10^{-2} M$	34	83,5	82,5				85	82,5	82
Mn^{2+}	33,5	69	85,5	51	71	82	79,5	83	83,5
$Mn^{2+} \quad 5 \cdot 10^{-4} M$	28	61	76				53	80	88
Mn^{7+}	97,5	94	95						
Co^{2+}	12,5	24,5	43						
Zn^{2+}	5	12,5	34,5	7	11	26	58,5	73,5	76
Hg^{2+}	5	7,5	19				0	13	59,5
Cu^{2+}	4	3	0				12	19	6,5
Ca^{2+}	0	0	0						
Mg^{2+}	9,5	25	51,5	3,5	14,5	13,5	53,5	73,5	75
Fe^{2+}	4	4	8						
Ni^{2+}							56,5	73,5	75
Fe^{3+}	13	47,5	66						

Acción de otros compuestos fenólicos y sustancias relacionadas

Raíz de cebada

% AIA destruido							
	Extr+ C R. Cebada				Extr+ C R. Cebada		
minutos	10	30	60	minutos	10	30	60
pHB $5.10^{-3} M$	0	2,5	2,5	pHC $5.10^{-3} M$	8,	9,5	16,5
pHB $5.10^{-4} M$	1,5	1,5	2,5	pHC $5.10^{-4} M$	43	76	83,5
pHB $5.10^{-5} M$	0	1,5	0	pHC M	2,5	0	0
oHB $5.10^{-4} M$	0	25	5	oHC $5.10^{-3} M$	7	12	16,5
Prot $5.10^{-4} M$	0	0	5	oHC $5.10^{-4} M$	7	13	26
Vani $5.10^{-3} M$	0	0	0	oHC M	7	5	12
Vani $5.10^{-4} M$	3	25	47	Caf $5.10^{-4} M$	7,5	5	5
Vani $5.10^{-5} M$	15,5	23,5	28	Fer $5.10^{-4} M$	2,5	0	2,5
F $5.10^{-3} M$	66 5	80	80	mHF $5.10^{-3} M$	46	48,5	48,5
F $5.10^{-4} M$	11	53,5	80	mHF $5.10^{-4} M$	24,5	35	43,5
F $5.10^{-5} M$	2,5	0	4,5	mHF $5.10^{-5} M$	8	8	13,5
oHF $5.10^{-3} M$	60	66	65	pHF $5.10^{-3} M$	73	73	73,5
oHF $5.10^{-4} M$	0	15	12,5	pHF $5.10^{-4} M$	11	11	11
oHF $5.10^{-5} M$	0	0	2,5	pHF $5.10^{-5} M$	0	0	0

% A I A destruido							
Extr + C R. Avena							
minutos	10	30	60	minutos	10	30	60
pHB $5 \cdot 10^{-4} M$	10	20	27	pHC $5 \cdot 10^{-3} M$	11	13	26
oHB $5 \cdot 10^{-3} M$	2,5	6,5	6,5	pHC $5 \cdot 10^{-4} M$	33,5	60	80
oHB $5 \cdot 10^{-4} M$	2,5	6,5	4,5	pHC $5 \cdot 10^{-5} M$	0	9	11
oHB $5 \cdot 10^{-5} M$	0	4,5	2,5	oHC $5 \cdot 10^{-3} M$	7	13,5	16
Prot $5 \cdot 10^{-4} M$	0	0	2,5	oHC $5 \cdot 10^{-4} M$	13,5	29,5	38,5
Gent $5 \cdot 10^{-3} M$	26	32,5	30,5	oHC $5 \cdot 10^{-5} M$	2,5	7	13,5
Gent $5 \cdot 10^{-4} M$	0	2	2	Caf $5 \cdot 10^{-3} M$	58,5	56,5	56,5
Vani $5 \cdot 10^{-4} M$	0	5	12	Caf $5 \cdot 10^{-4} M$	10,5	8	4
				Caf $5 \cdot 10^{-5} M$	2	2	0
Clorg $5 \cdot 10^{-5} M$	25	39	78,5	Fer $5 \cdot 10^{-4} M$	0	0	0
				Fer $5 \cdot 10^{-5} M$	0	0	7
				Fer $5 \cdot 10^{-6} M$	0	0	3,5
				Fer $5 \cdot 10^{-7} M$	0	0	3,5

% AIA destruido							
<div> <div>Extr + C</div> <div>R. Avena</div> </div>							
minutos	10	30	60	minutos	10	30	60
Cum $5 \cdot 10^{-3} M$	3	8	6	F $5 \cdot 10^{-3} M$	38	64,5	74
Cum $5 \cdot 10^{-4} M$	3	3	6	F $5 \cdot 10^{-4} M$	19	33,5	47,5
Cum $5 \cdot 10^{-5} M$	0	6	3	F $5 \cdot 10^{-5} M$	0	5	7
Esc $5 \cdot 10^{-3} M$	0	5	0	Asc $5 \cdot 10^{-3} M$	4,5	0	2,5
Esc $5 \cdot 10^{-4} M$	7,5	15	20	Asc $5 \cdot 10^{-4} M$	2,5	0	4,5
Esc $5 \cdot 10^{-5} M$	2,5	7,5	10	Asc $5 \cdot 10^{-5} M$	2,5	0	0

Estos ensayos realizados para el estudio de los cofactores sobre extractos tratados con carbón activo de raíces de ceregl, llevan incorporado $Mn^{2+} 5 \cdot 10^{-3} M$.

Efectos comparativos de las acciones de la maleicohidrazida y los difenoles sobre el sistema AIA-oxidasa.

% AIA destruido			
Extr + C R. Avena			
minutos	10	30	60
MH $5 \cdot 10^{-3} M$	17	38	52
pHF $5 \cdot 10^{-3} M$	65	65	65
mHF $5 \cdot 10^{-3} M$	21	37,5	45,5
MH $5 \cdot 10^{-4} M$	0	0	0
pHF $5 \cdot 10^{-4} M$	4,5	3,5	5,5
mHF $5 \cdot 10^{-4} M$	11	21,5	35,5

variación del comportamiento de la maleicohidrazida y el p-hidroxifenol frente a los extractos tratados y naturales de raíces de avena a diferentes pHs

% AIA destruido												
pH	5,6						6,8					
	Ext R. Avena			Ext + C R. Avena			Ext R. Avena			Ext + C R. Avena		
minutos	10	30	60	10	30	60	10	30	60	10	30	60
MH $5 \cdot 10^{-3} M$	1	2	5,5	18	38,5	54,5	2	2	4	0	6,5	9,5
pHF $5 \cdot 10^{-3} M$	68	70	70	64,5	64	62,5	70	71	71	61,5	61,5	59,5

Efectores Del sistema AIA-oxidasa

Consideramos efectores a los distintos compuestos que modifican la actividad enzimática, sin que sean componentes esenciales del complejo funcional enzimático

a) Compuestos de naturaleza fenólica

% AIA destruido							
Extracto							
R Cebada							
minutos	10	30	60	minutos	10	30	60
pHB $5 \cdot 10^{-3} M$	32,5	73,5	73,5	pHC $5 \cdot 10^{-3} M$	12,5	15	20
pHB $5 \cdot 10^{-4} M$	46,5	75,5	75,5	pHC $5 \cdot 10^{-4} M$	14	20,5	58
pHB $5 \cdot 10^{-5} M$	61,5	78,5	76	pHC $5 \cdot 10^{-5} M$	42,5	57,5	77
oHB $5 \cdot 10^{-4} M$	50	80	82,5	oHC $5 \cdot 10^{-3} M$	42,5	71	83,5
Gen $5 \cdot 10^{-3} M$	31,5	34,5	37,5	oHC $5 \cdot 10^{-4} M$	42,5	75,5	82,5
Gen $5 \cdot 10^{-4} M$	3	3	9,5	oHC $5 \cdot 10^{-5} M$	49	75,5	82,5
Ver $5 \cdot 10^{-3} M$	67,5	84	84	Caf $5 \cdot 10^{-3} M$	57	57	54
Vani $5 \cdot 10^{-3} M$	0	1	6,5	Sin $5 \cdot 10^{-4} M$	0	4	4
Vani $5 \cdot 10^{-4} M$	20	44,5	73,5	Fer $5 \cdot 10^{-4} M$	1	14,5	0
Vani $5 \cdot 10^{-5} M$	62,5	75,5	80				

% AIA destruido			
Extracto R. Cebada			
minutos	10	30	60
Cum $5.10^{-4} M$	29,5	73	80,5
Esc $2,5.10^{-3} M$	7	9	11,5
Esc $5.10^{-4} M$	11,5	20,5	27,5
Esc $5.10^{-5} M$	34	75	86,5

% AIA destruido							
Extracto R. Cebada							
minutos	10	30	60		10	30	60
F $5.10^{-3} M$	14	67,5	72,5	mHF	1,5	51,5	57
F $5.10^{-4} M$	35	75	80	mHF	63	77	77
F $5.10^{-5} M$	40	77,5	80	mHF	66	83	83
oHF $5.10^{-3} M$	72	65,5	75	pHF	73,5	76,5	76,5
oHF $5.10^{-4} M$	6,5	6,5	6,5	pHF	9	9	9
oHF $5.10^{-5} M$	56	72	84,5	pHF	51,5	76,5	82,5

% AIA destruido							
Extr + C				regenerado R Avena			
minutos	10	30	60	minutos	10	30	60
B $5.10^{-4} M$	22,5	60	76				
pHB $5.10^{-3} M$	1,5	9,5	23	pHC $5.10^{-3} M$	8	6,5	7
pHB $5.10^{-4} M$	1,5	14,5	25,5				
pHB $5.10^{-5} M$	25,5	66,5	88				
oHB $5.10^{-4} M$	16,5	43	65	oHC $5.10^{-4} M$	23,5	58	71,5
V $5.10^{-3} M$	0	0	0				
V $5.10^{-4} M$	32	55,5	75,5				
V $5.10^{-5} M$	39	60	80,5				

% AIA destruido							
Extr + C				regenerado R Avena			
minutos	10	30	60	minutos	10	30	60
F $5.10^{-3} M$	11,5	32,5	63,5	Cum $5.10^{-4} M$	20	47,5	69,5
pHF $5.10^{-3} M$	70	70	68	Es $2.5.10^{-3} M$	0	0	0
pHF $5.10^{-4} M$	10	3,5	11,5	Es $5.10^{-4} M$	8,5	11	16
pHF $5.10^{-5} M$	13,5	33,5	42,5	Es $5.10^{-5} M$	15	35	60

Compuestos reductores

% A / A destruido							
Extr R Cebada							
minutos	10	30	60	minutos	10	30	60
Asc $5 \cdot 10^{-3} M$	7,5	6,5	8,5	SNa ₂ $5 \cdot 10^{-4} M$	4	12	72
Asc $5 \cdot 10^{-4} M$	59	80	85	SO ₃ HNa $5 \cdot 10^{-3} M$	31	61,5	78,5
Asc $5 \cdot 10^{-5} M$	47,5	80,5	88,5	SO ₃ HNa $5 \cdot 10^{-4} M$	61,5	82	88,5
SNa ₂ $5 \cdot 10^{-3} M$	2	0	4	SO ₃ HNa $5 \cdot 10^{-5} M$	61,5	84	87,5

% AIA destruido			
<div> <div>Extr + C</div> <div>regenerado</div> <div>R Avena</div> </div>			
minutos	10	30	60
Asc $5 \cdot 10^{-3} M$	1	2	2
Asc $5 \cdot 10^{-4} M$	0	0	2
Asc $5 \cdot 10^{-5} M$	0	25,5	55,5

Otras actividades de los compuestos fenólicos

Raíz de cebada

En la tabla siguiente se presentan los diversos efectos del ácido p-hidroxicinámico a distintas concentraciones y sobre extractos diferentes:

% AIA destruido									
<div>Extr</div> <div>R Cebada</div>				<div>Extr + C</div> <div>R Cebada</div>			<div>Extr + C</div> <div>regenerado</div> <div>R Cebada</div>		
minutos	10	30	60	10	30	60	10	30	60
pHC $5 \cdot 10^{-3} M$	12,5	15	20	8,5	9,5	16,5	0	6,5	10
pHC $5 \cdot 10^{-4} M$	14	20,5	58	43	76	83,5	66,5	70	72
pHC $5 \cdot 10^{-5} M$	42,5	57,5	77	2,5	0	0	74	77,5	75,5

Raiz de avena

El extracto natural de raíz de avena no tiene actividad por si mismo, sin embargo el p-HC lo reactiva, probablemente por modificar el balance de los efectores positivos y negativos del sistema.

% AIA destruido							
Extr R. Avena							
minutos	10	30	60	minutos	10	30	60
pHB $5 \cdot 10^{-3} M$	0	0	0	pHC $5 \cdot 10^{-4} M$	37	64,5	85,5
pHB $5 \cdot 10^{-4} M$	0	9	1	caf $5 \cdot 10^{-3} M$	55,5	57,5	55,5
pHB $5 \cdot 10^{-5} M$	0	0	2,5	caf $5 \cdot 10^{-4} M$	8,5	10,5	8,5
Gent $5 \cdot 10^{-3} M$	31	31	31	caf $5 \cdot 10^{-5} M$	2	2	0
Gent $5 \cdot 10^{-4} M$	5	2,5	2,5				

% AIA destruido							
Extr R. Avena							
minutos	10	30	60	minutos	10	30	60
F $5 \cdot 10^{-3} M$	0	6,5	11	oHF $5 \cdot 10^{-3} M$	55,5	60	55,5
pHF $5 \cdot 10^{-3} M$	72	72	69,5	mHF $5 \cdot 10^{-3} M$	31	33,5	33,5
pHF $5 \cdot 10^{-4} M$	7,5	7,5	7,5	pBQ $5 \cdot 10^{-3} M$	64	61,5	61,5
pHF $5 \cdot 10^{-5} M$	0	2,5	2,5				

Purificación Del Sistema Enzimático

a) Dialisis

Extracto crudo (2 grs. de raíces frescas de cebada disgregadas en 10 ml. de medio tamponado).

5 ml. de extracto centrifugado en saco de Sigma 250-7 frente a la misma solución tamponada de fosfatos 22 mM a pH=5,6 durante 24 horas en nevera.

Actividad de los extractos:

I = Extracto crudo (natural) diluido a la mitad

II-V= Extracto dializado de 5 ml. diluido hasta 10 ml.

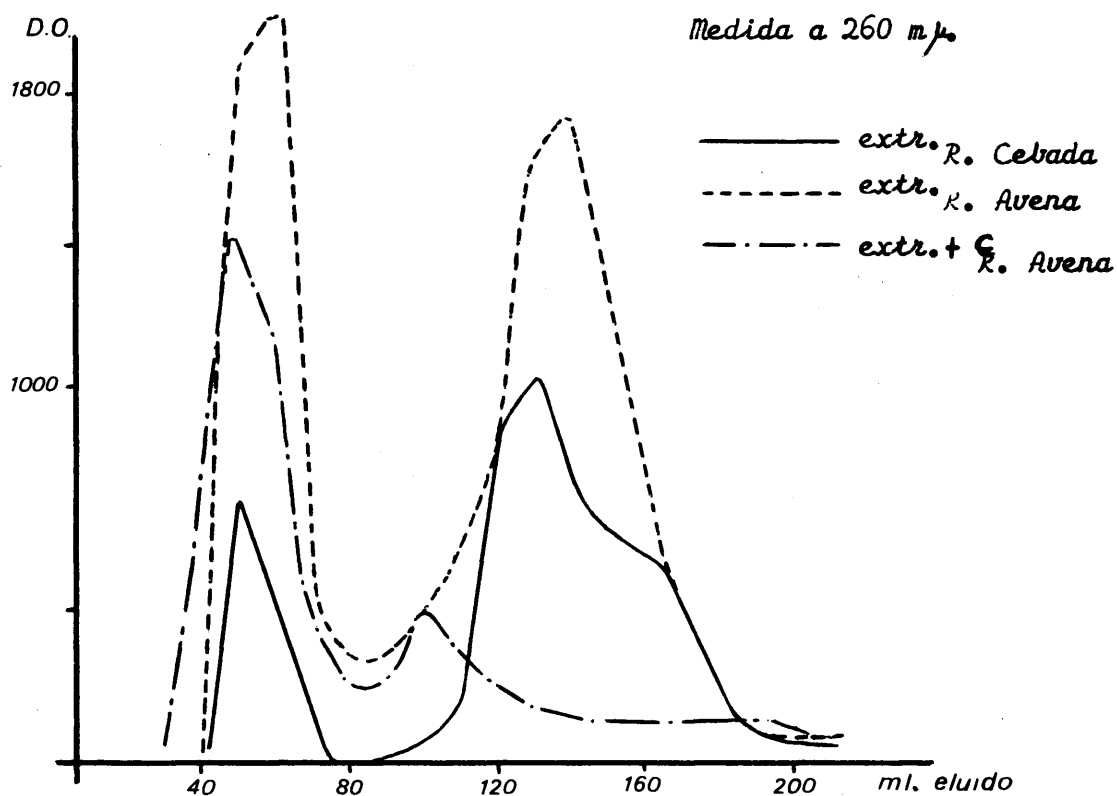
Esquema experimental					
	I	II	III	IV	V
Extracto	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
tampon pH=5.6	3,5	3,5	3	2,5	2
Mn ²⁺ 5.10 ⁻³ M			0,5		0,5
pHC 5.10 ⁻⁴ M				1	1
AIA 200 γ/ml	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
D.O. x 100					
minutos	I	II	III	IV	V
10	29	33 ₅	38	33	33
30	19	26 ₅	36	26	25
60	14 ₅	22	35	21	20

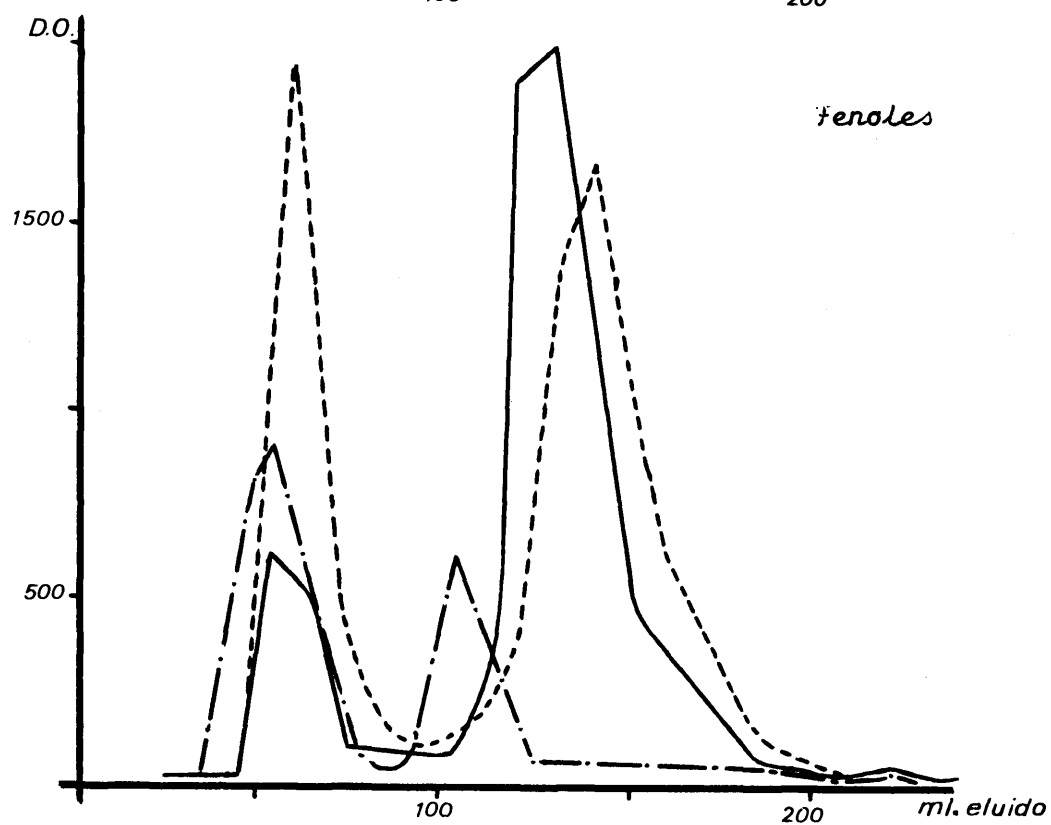
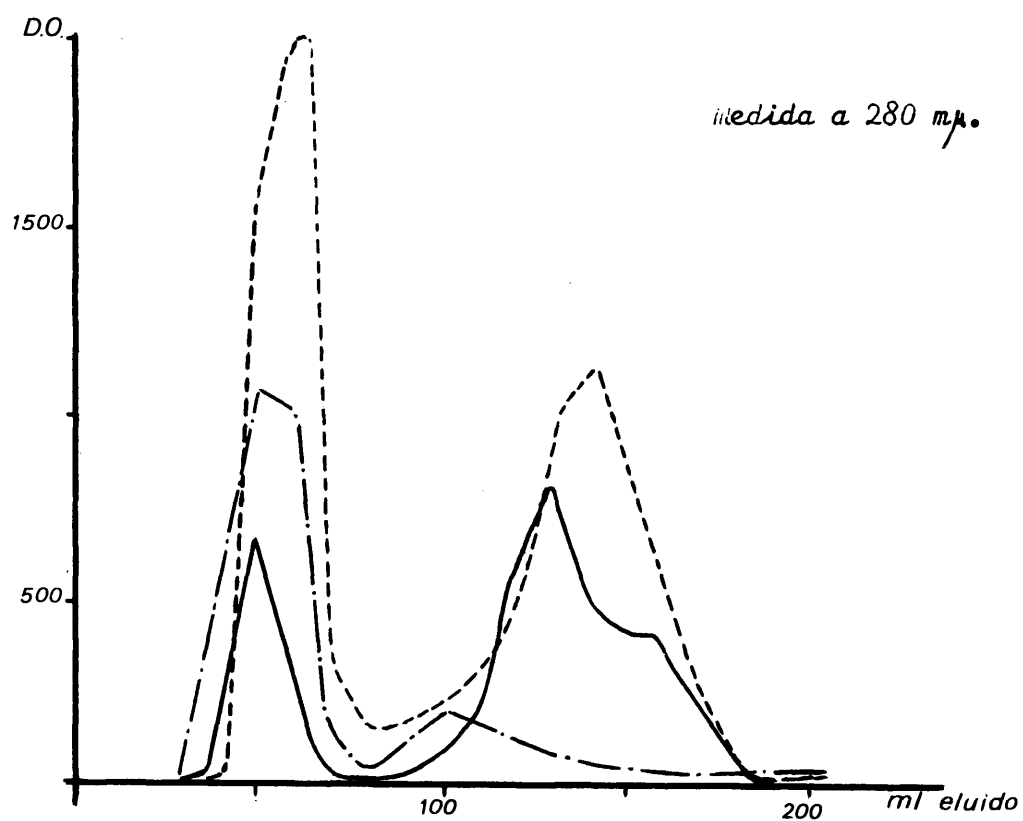
b) Cromatografía

Columnas de 2 50 cm. cargadas con sephadex G-50 Fine hasta una altura de 42 cm. Se equilibran a baja temperatura (5°C) con solución tamponada de fosfatos 22 mM a pH=6,8 y se introducen muestras de 10 ml. de raíces (5grs. de raíces frescas/15 ml. de medio tamponado).

Las medidas colorimétricas de fenoles se han realizado por el método del reactivo de Folin-Ciocalteu.

En las graficas se presentan los resultados en ml. de eluido frente a densidad optica (D.O.)





	Raiz de Cebada			Raiz de Avena					
	Extracto			Extracto			Extr + C		
Eluido	D.O.		Fenoles	D.O.		Fenoles	D.O.		Fenoles
ml	260	280		260	280		260	280	
10	.013	.008	.020	.009	.009	.027	.003	.004	.020
20	.009	.004	.025	.009	.012	.033	.009	.013	.030
30	.011	.005	.025	.003	.000	.027	.009	.008	.025
40	.016	.014	.025	1.880	1.580	.950	.703	.540	.455
50	.763	.690	.660	2.000	2.000	2.000	1.446	1.065	1.000
60	.317	.312	.480	.387	.331	.435	1.176	.970	.555
70	.034	.034	.090	.200	.172	.230	.322	.153	.120
80	.021	.020	.075	.262	.150	.155	.153	.036	.038
90	.032	.025	.075	.368	.232	.165	.162	.090	.138
100	.077	.063	.105	.487	.310	.220	.390	.202	.630
110	.248	.178	.320	.825	.520	.515	.270	.170	.325
120	.830	.620	1.900	1.600	1.025	1.350	.140	.153	.055
130	1.050	.845	2.000	1.770	1.150	1.700	.104	.102	.050
140	.650	.498	1.250	1.250	.895	1.050	.088	.075	.040
150	.555	.440	.405	.725	.540	.565	.075	.062	.033
160	.505	.425	.285	.337	.283	.348	.064	.057	.020
170	.280	.211	.145	.086	.071	.115	.052	.046	.020
180	.075	.060	.055	.053	.044	.070	.048	.032	.020
190	.018	.018	.025	.020	.015	.045	.030	.028	.018
200	.006	.006	.023	.011	.009	.035	.018	.015	.015
210	.024	.019	.027	.027	.024	.037	.020	.018	.020
220	.013	.015	.020	.009	.007	.028	.010	.006	.010

Fenoles libres

El extracto crudo de raíz de avena se extrae con acetato de etilo, se elimina el disolvente y el resto sólido se disuelve en 10 ml. de tampón fosfato pH= 6,8 y se comatografía en columna de sephadex y-50

Fenoles			
ml eluido	D.O.	ml eluido	D.O.
10	.020	120	.340
20	.013	130	.315
30	.018	140	.193
40	.023	150	.100
50	.068	160	.065
60	.158	170	.040
70	.050	180	.038
80	.050	190	.043
90	.053	200	.033
100	.065	210	.038
110	.075	220	.063

Las medidas están realizadas por el método colorimétrico del reactivo Folin - Ciocalteu

Actividad enzimática del apoenzima purificado cromatográficamente

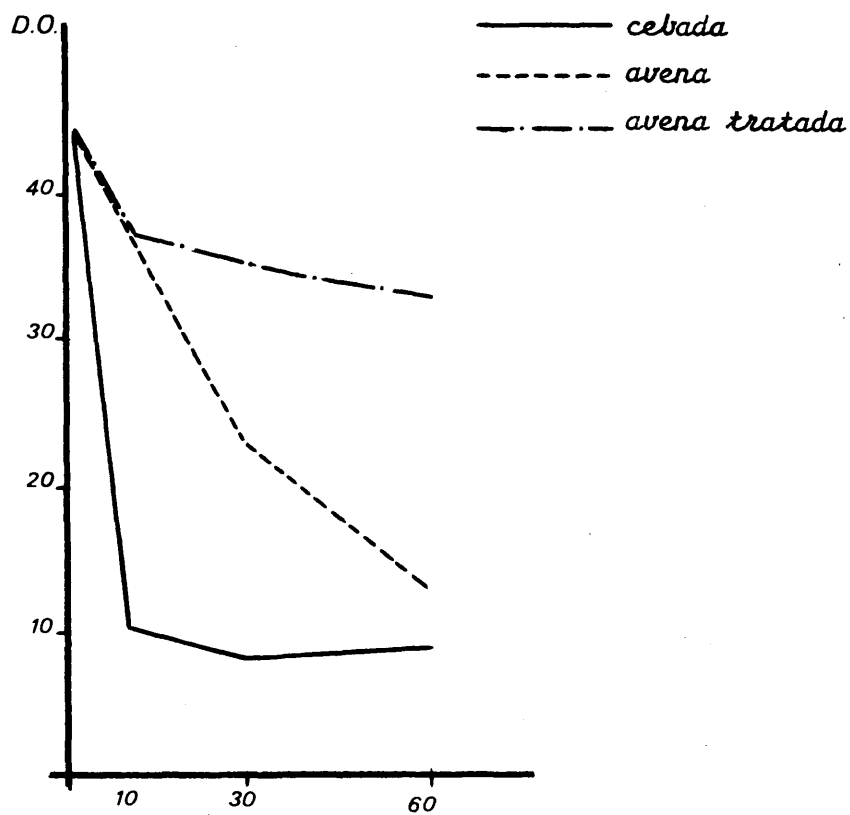
La medida de la actividad enzimática de las fracciones eluidas se efectuó según el esquema:

Esquema experimental	
Apoenzima G-50	1 ml
Mn ²⁺ 5.10 ⁻³ M	0,5 "
pHC 5.10 ⁻⁴ M	1 "
tampon pH=5,6	2 "
A / A 200 γ /ml	1,5 "

D O x 100									
minutos	Extr R Cebada 40	Extr R Cebada 40	Extr + C R Cebada 40	Extr R Cebada 50	Extr R Cebada 50	Extr + C R Cebada 50	Extr R Cebada 60	Extr R Cebada 60	Extr + C R Cebada 60
10	15	45 ₅	38 ₅	10	37	37 ₈	40	41	42
30	7	40	36 ₃	8	22 ₅	35 ₅	28	35	36
60	8	34	35 ₈	9	12 ₅	32 ₈	18 ₅	29	30

El subíndice indica la fracción de eluido de la columna de Sephadex G-50 de donde ha sido obtenido el apoenzima

Se representa en D.O. frente a tiempo la fracción de eluido de 50 ml.



Actividad del apoenzima purificado bajo diversos tratamientos

a) Reactivación con cofactores exógenos

D O \times 100						
minutos	Extr	Extr + C	Extr + H ₂ O ₂	Extr	Extr + C	Extr + H ₂ O ₂
	R. Avena 50	R. Avena 50	R. Avena 50	R. Avena 60	R. Avena 60	R. Avena 60
10	40	40	42	41	39 ₅	40
30	39	38 ₅	41	38	39	33
60	34	37	35	30 ₅	36	27

Extr + H₂O₂ R. Avena quiere decir que el apoenzima utilizado extraído por cromatografía en columna de Sephadex G-50 se ha tratado con H₂O₂ y mantenido durante 16 horas en nevera

b) Reactivación con cofactores naturales

La reactividad del apoenzima con sus cofactores naturales separados cromatográficamente, se prueba desde la fracción de 90 ml. a partir de la cual comienza a aumentar el contenido en fenoles. Los resultados fueron:

En raíz de cebada: positivo el intervalo 140-170 ml.

En raíz de avena: positivo el intervalo 150-160 ml.

Probados los eluidos de cebada sobre su propio extracto tratado con carbón activo, es positivo el intervalo 120-160 ml.

La diferencia de actividad entre los apoenzimas de raíces de cebada y avena con sus respectivos cofactores naturales se presentan para las fracciones de eluido 150 y 160 ml.

D O x 100				
minutos	Extr R Cebada 150	Extr R Avena 150	Extr R Cebada 160	Extr R Avena 160
10	35	36 ₅	43	38 ₅
30	16	30 ₈	30	37
60	6	26	18	33

Probados los eluidos de avena sobre el extracto natural de cebada resulta inhibidora la fracción 120 ml.

Probadas las fracciones correspondientes al intervalo 90-170 ml. de avena sobre su extracto natural resultaron todas debilmente activas más acentuadamente las 100, 150, 160 y 170 ml. Sin embargo sobre extractos con carbón activo resultan inactivas todas ellas.

D O x 100							
minutos	I	II	III	IV	V	VI	C
10	43 ₅	41 ₅	40 ₅	41 ₅	40 ₅	39 ₅	45 ₅
30	43 ₅	31 ₅	40	33 ₅	35	33 ₅	
60	42	15	26	24	24	24 ₈	

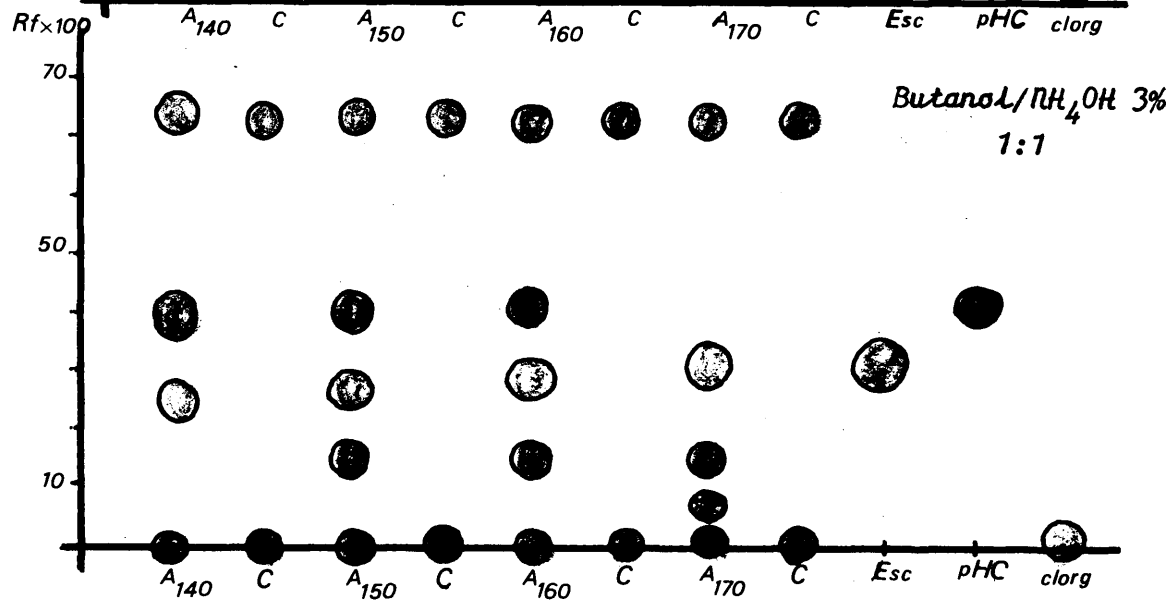
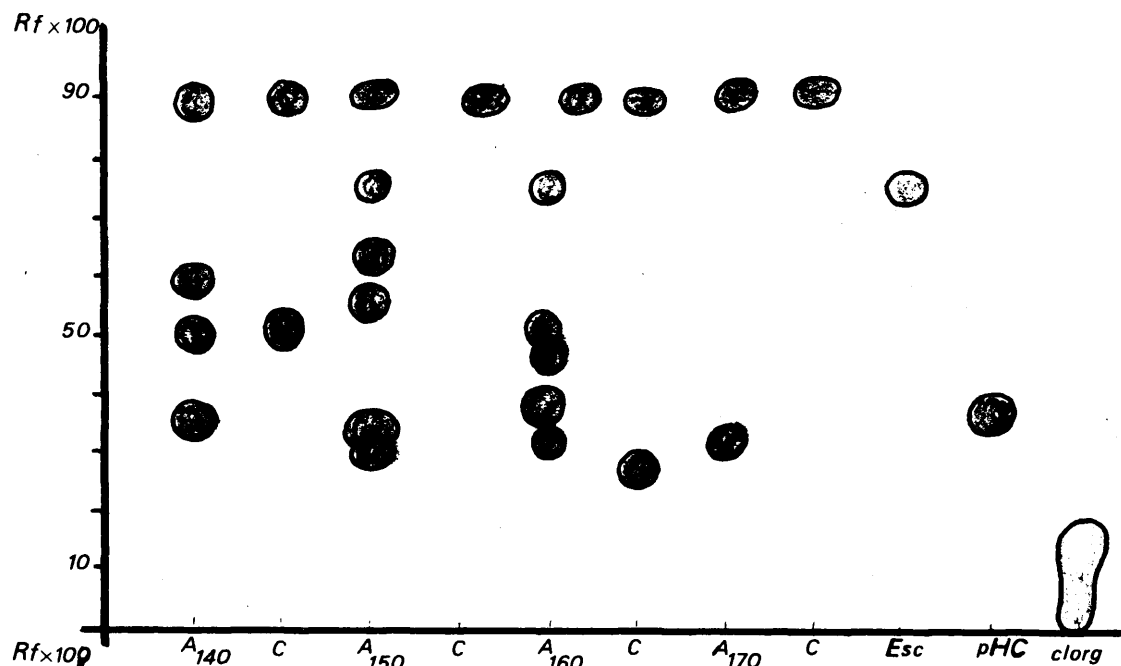
Los resultados anteriores se obtuvieron en ensayos realizados según el esquema experimental.

Esquema experimental							
	I	II	III	IV	V	VI	C
Extr R Avena	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	-
tampon pH= 5,6	2,5 "	2 "	2 "	2 "	2 "	2 "	3 ml
Mn ²⁺ 5.10 ⁻³ M	-	0,5 "	0,5 "	0,5 "	0,5 "	0,5 "	-
pHIC 5.10 ⁻⁴ M	1 "	1 "	-	-	-	-	-
frac 140 ml G-50	-	-	1 "	-	-	-	-
frac 150 ml G-50	-	-	-	1 "	-	-	-
frac 160 ml G-50	-	-	-	-	1 "	-	-
frac 170 ml G-50	-	-	-	-	-	-	1 "
AIA 200g/ml	1,5 "	1,5 "	1,5 "	1,5 "	1,5 "	1,5 "	1 "

Cromatografía en capa fina de los cofactores naturales

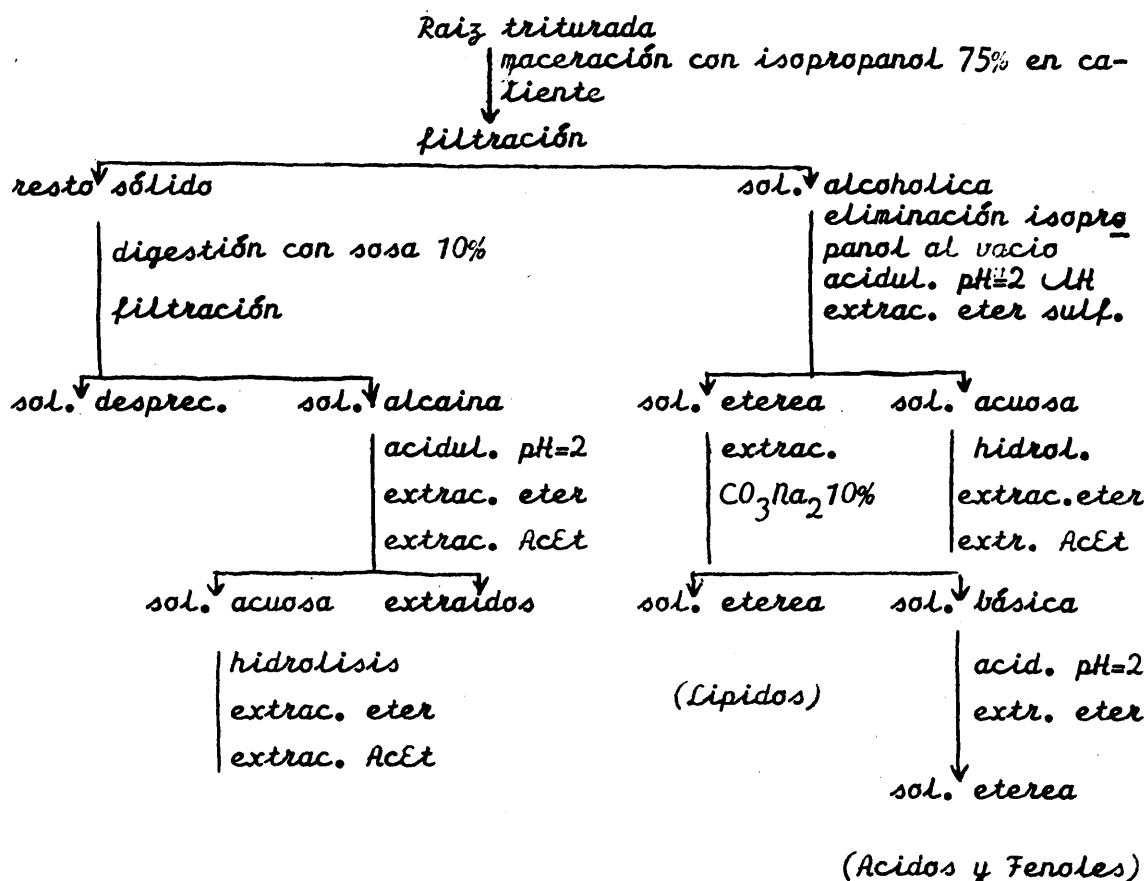
Las fracciones que presentan actividad como cofactores fueron aciduladas a pH=2 y extraídas con acetato de etilo, después se cromatografiaron en capa fina sobre soporte de Kieselgel G nach Stahl de 2 ml. de espesor y se desarrollaron con los eluyentes que se indican en cada caso.

Benceno/Ac. acético/Agua 6:7:3

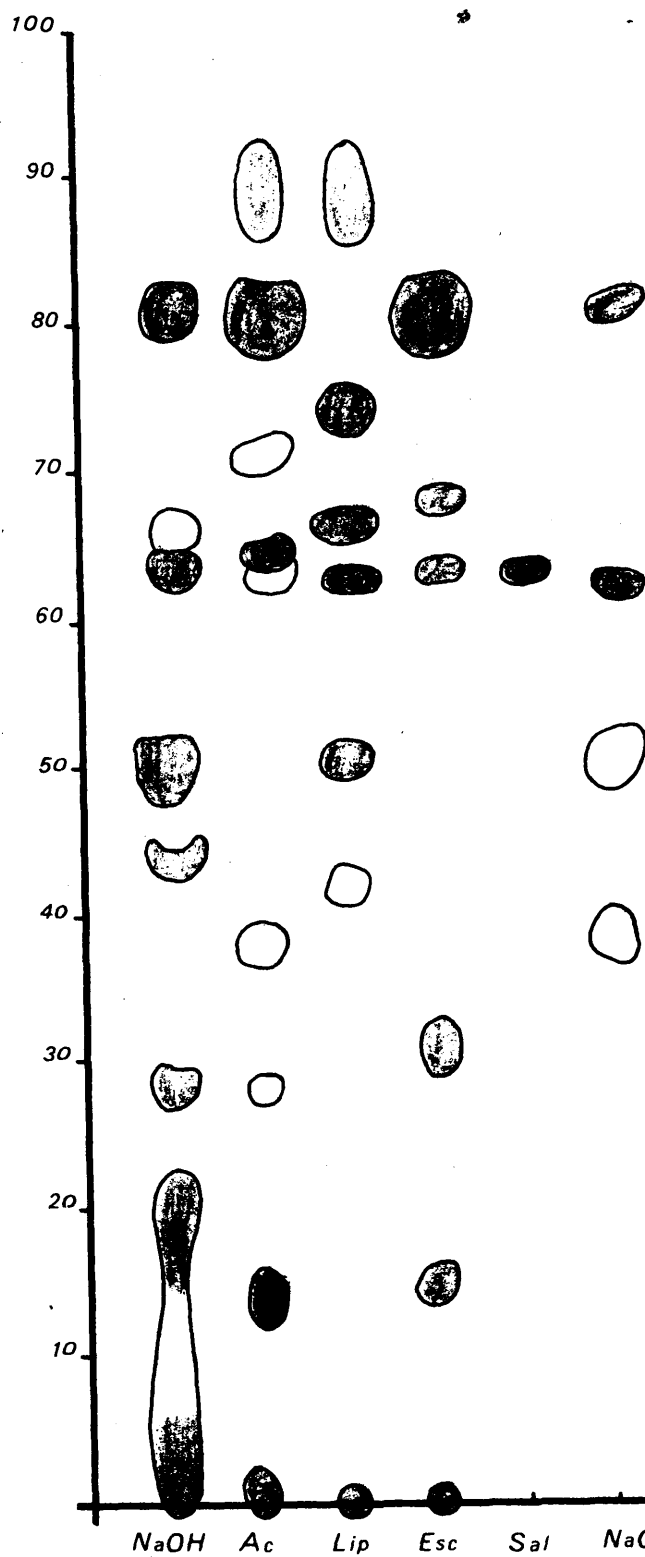


Aislamiento y Caracterización De Algunos Compuestos Naturales De Las Raíces

Las diferencias existentes en el comportamiento de los sistemas enzimáticos de las raíces de cebada y de avena tienen su confirmación en la diferente cantidad y naturaleza de las sustancias que los forman. El esquema seguido para una separación primaria fué el siguiente:



Las fracciones así obtenidas se cromatografiaron en capa fina utilizando como soporte Kieselgel y como eluyente distintos sistemas. Los resultados para la avena utilizando como eluyente: Aceta



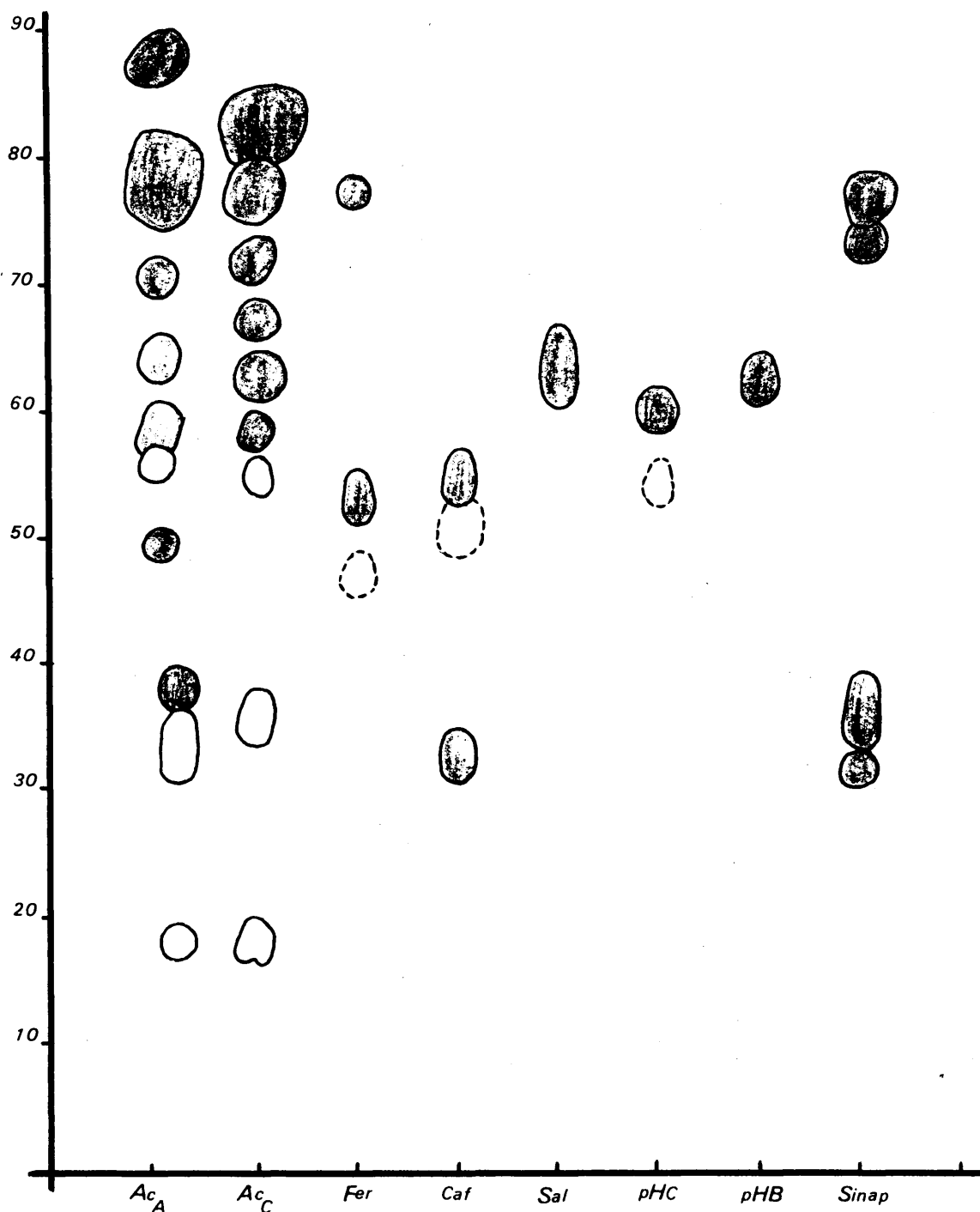
to de etilo/alcohol etílico/hidroxido amónico al $3,5 \cdot 10^{-3}$ M 5:2:3 v/v son los representados

Las manchas sin colorear aparecen despues de pulverizar con cloruro ferrico en medio basico y calentar a 170°C duran-

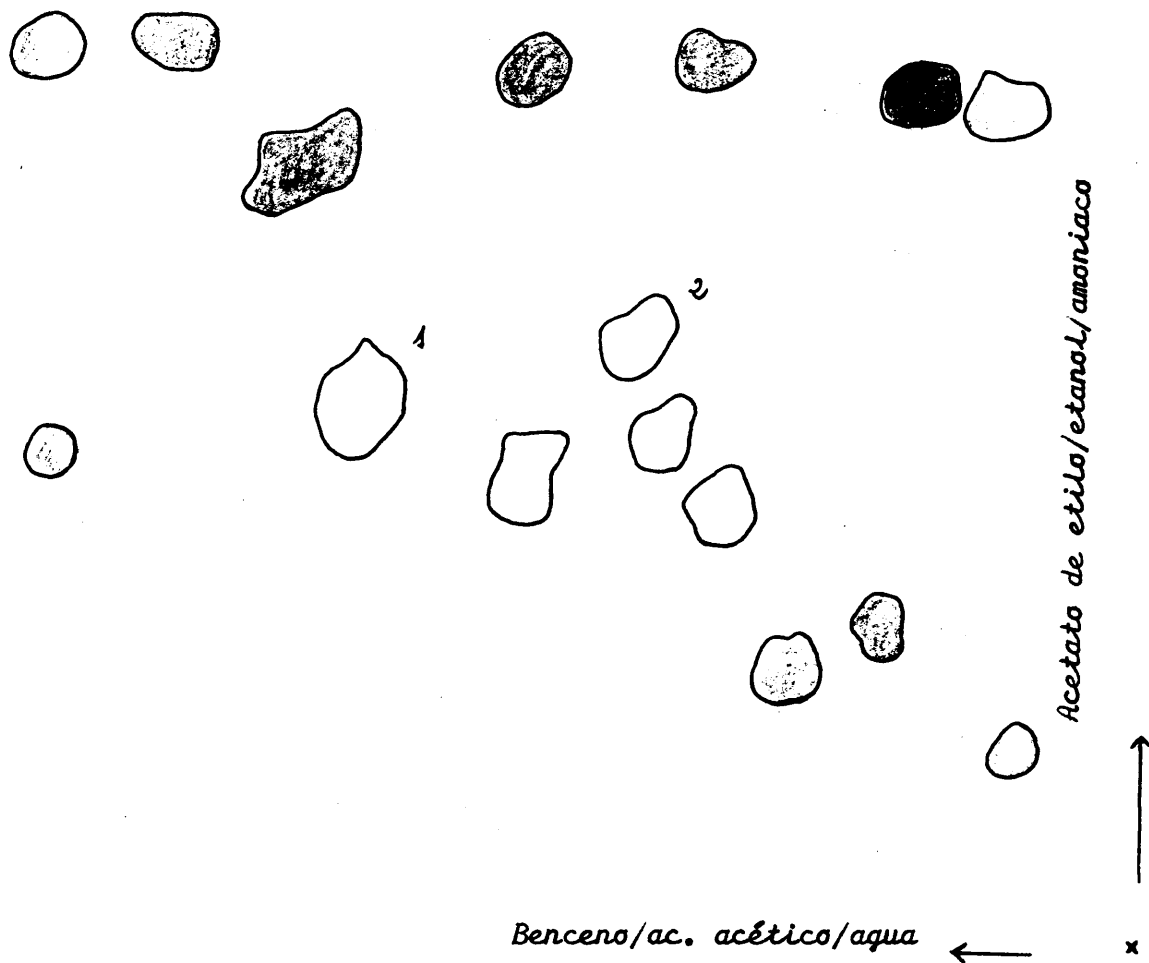
te 30 minutos.

Los colores corresponden a la fluorescencia con luz U.V.

Sobre el mismo soporte y desarrollado por el mismo sistema se presenta una placa comparativa para ácidos de cebada y avena así como diversos controles.



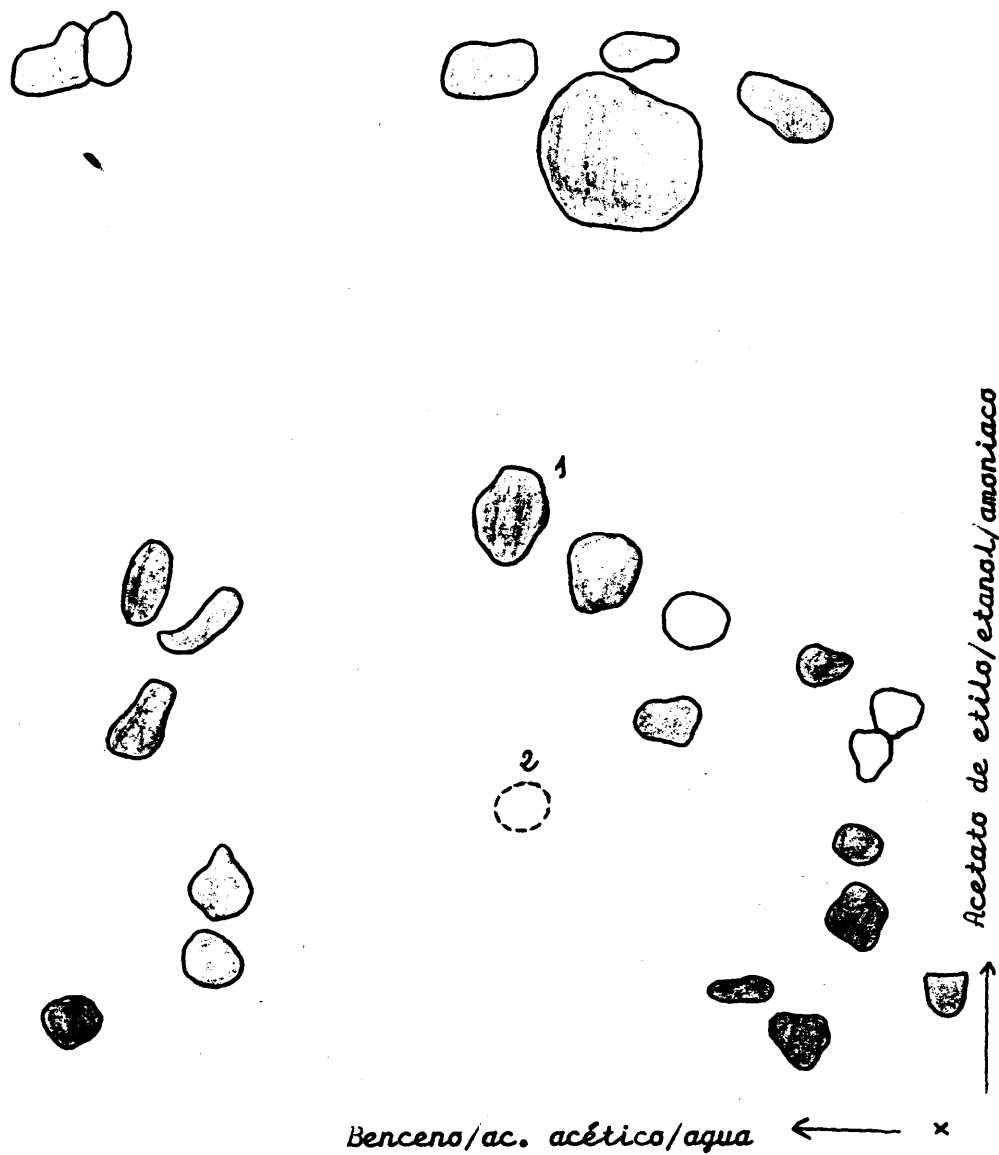
Los ácidos de cebada y avena, así como algunos controles se sometieron a cromatografía en dos direcciones en Acetato de etilo/etanol/hidroxido amónico $3,5 \cdot 10^{-3}$ M 5:2:3 v/v y Benceno/ac. acético/aqua 6:7:3 v/v obteniéndose los resultados siguientes:



Acidos De Cebada

Las manchas sin colorear, visibles con $\text{Fe}(\text{CN})_6^{2-}$ y MnO_4^-
1 y 2 amarillo tostado con cloruro ferrico.

Los colores corresponden a la fluorescencia con luz U.V.



Acidos De Avena

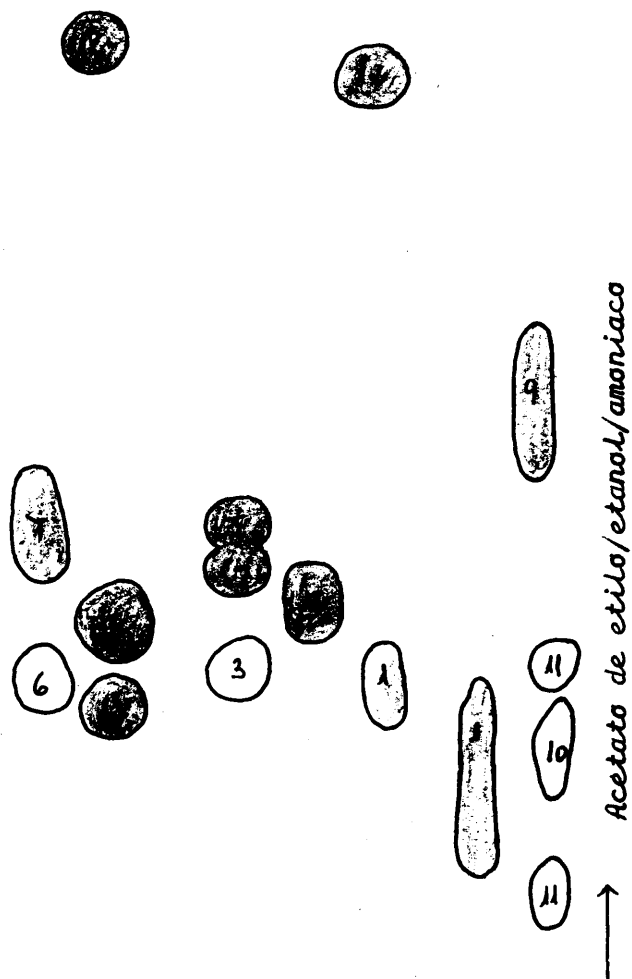
Con cloruro ferrico:

1 violeta

2 amarillo tostado

Con cloruro ferrico:

- 1 gris verdoso
- 2 gris azulado
- 3 amarillo
- 4 tostado
- 5 amarillo tostado
- 6 tostado
- 7 violeta
- 10 gris
- 12 pardo rojizo
- 13 rosa



Benceno/ac. acético/agua ← x

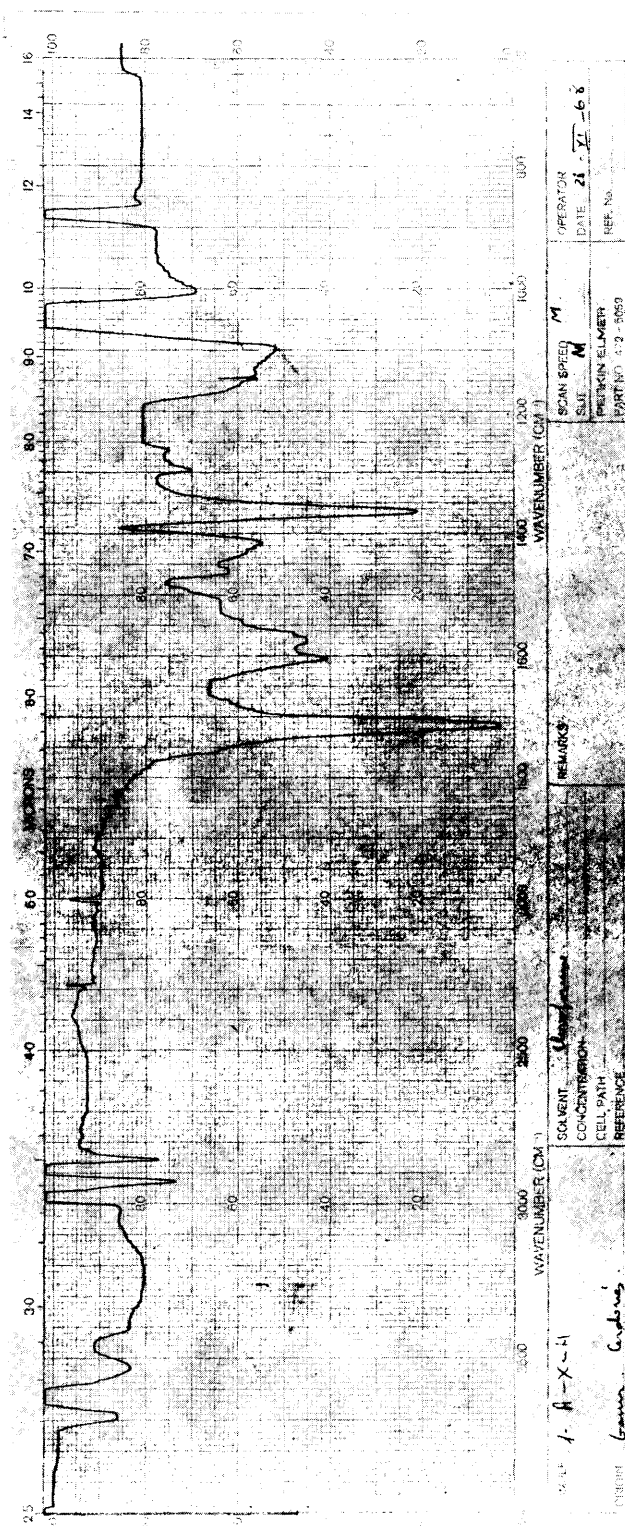
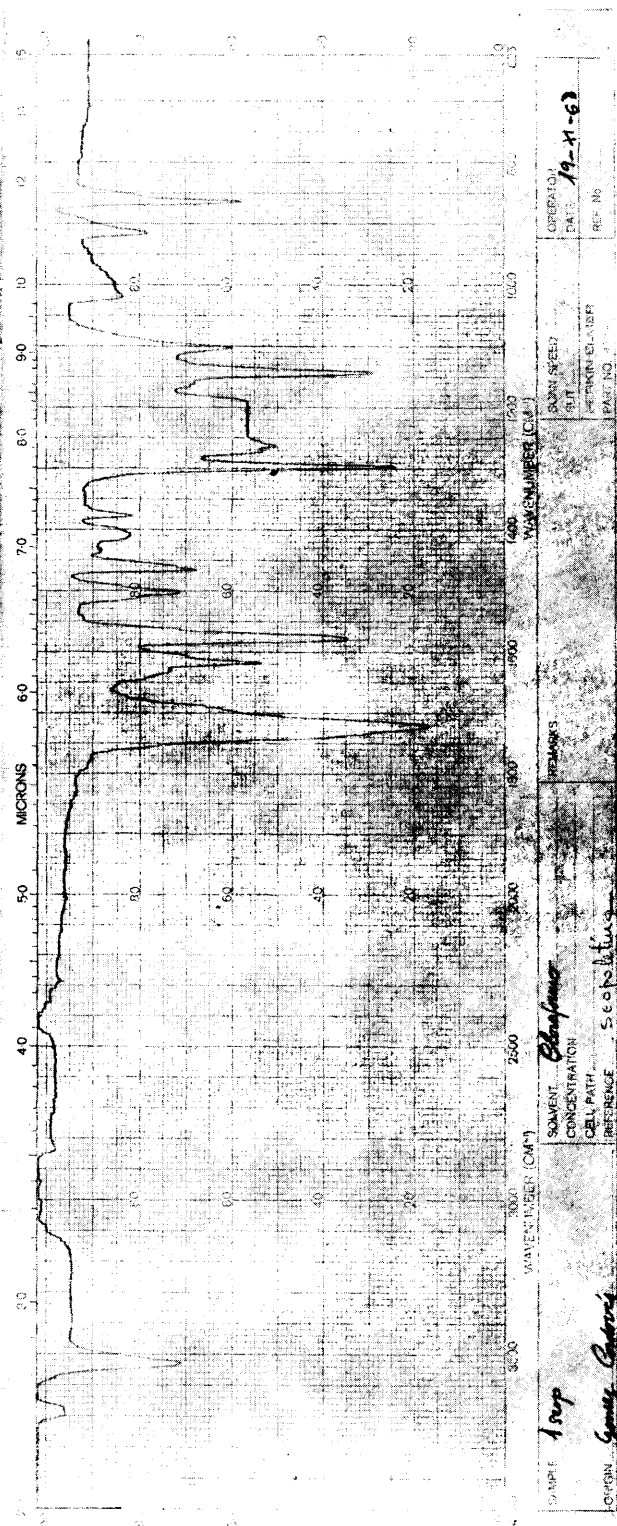
- | | | | |
|-------------|---------------|----------------|-----------------|
| 1 cafeico | 5 pHC | 8 vanillina | 11 quinico |
| 2 gentisico | 6 vanillinico | 9 catequina | 12 escopoletina |
| 3 pHB | 7 salicilico | 10 clorogenico | 13 sinápico |
| 4 ferúlico | | | |

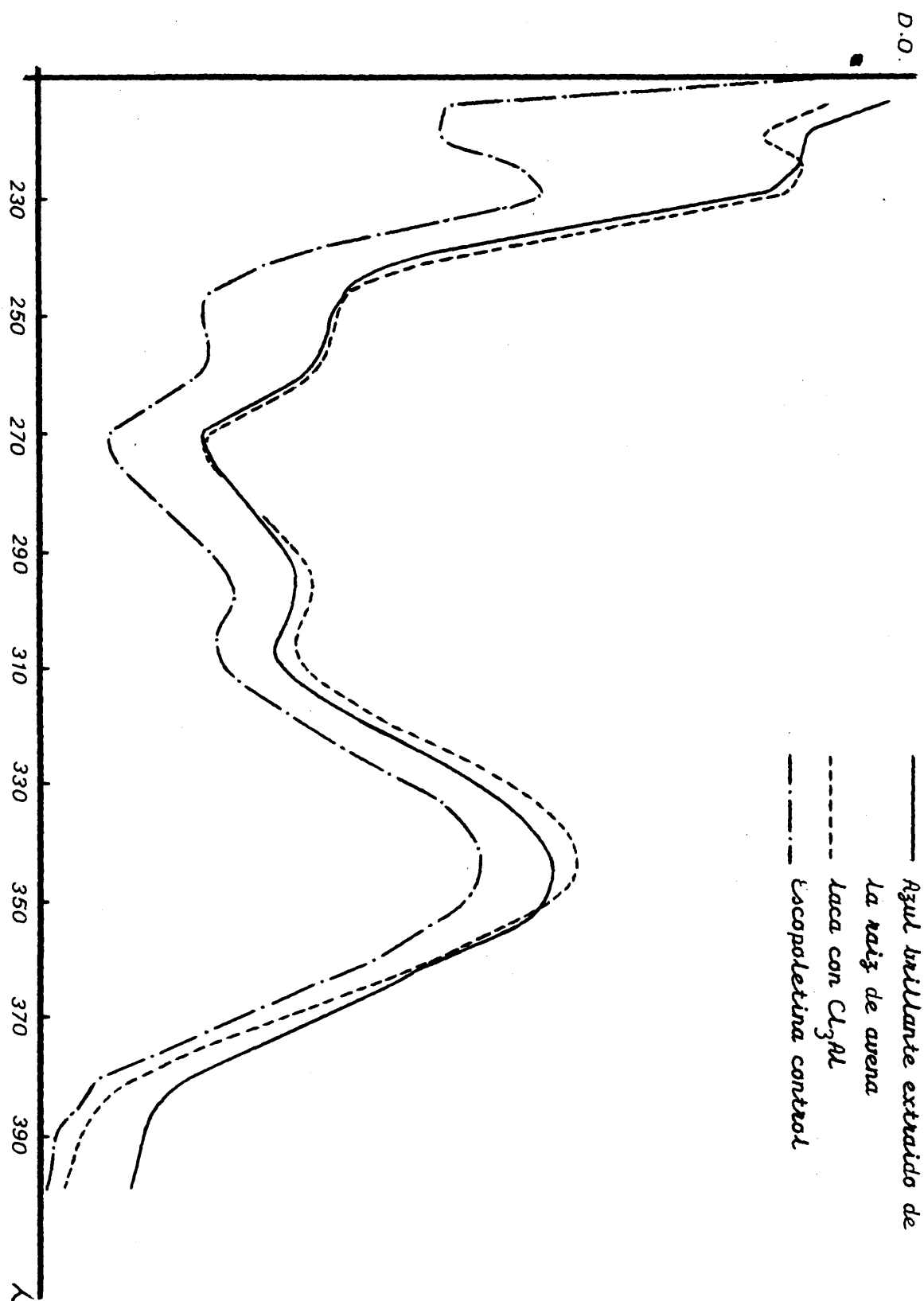
Aislamiento y Caracterización De La Escopoletina

La purificación en diversos sistemas en cromatografía sobre capa fina, preparativa, condujo al aislamiento de una sustancia de fluorescencia azul de $R_f = .80 - .85$ en Acetato de etilo/etanol/amoniaco que presenta las características que se indican a continuación y que ha sido identificada como la escopoletina

Sist. eluyentes	A	B	C	D	E	F	I
azul brillante	.84	.76	-	.34	.78	.60	.76
escopoletina	.85	.78	.78	.34	.75	.70	.78

El espectro U. V. comparativo de ambos compuestos así como el correspondiente a sus lacas formadas con cloruro de aluminio y el obtenido en I, R. confirma la identidad de sus naturalezas





Compuestos fluorescentes

A continuación se presentan en un cuadro, las sustancias aisladas de la fracción "Ácidos y fenoles" de los extractos de raíz de avena, con algunas de sus características y su posible naturaleza

Compuesto	R _f								Observaciones	
Fluorescencia UV	A	B	C	D	E	F	G	H	U V max	Naturaleza posible
Violeta	.58, .65	.23, .34							220, 295	ac. benzoico
Azul violeta	.35	.27		.16					225, 290	ac. benzoico
Amarillo	.92	.85		.10			.22	.72	255, 300	cumarina
Amarillo pálido	.42			.25					270, 335	cumarina
Violeta	.62	.45			.85				285, 315	ac. cinámico
Amarillo verdoso		.25, .34	.46, .55	.66	.94	.80		.91	285-290, 305-310	ac. cinámico

A: Acetato de etilo/etanol/hidroxido amónico 3, $5 \cdot 10^{-3}$ M 5:2:3 v/v

B: Butanol/hidroxido amónico 3, $5 \cdot 10^{-3}$ M 1:1 v/v

C: Butanol/etanol/agua 4:1:5 v/v

D: Benceno/ac. acético/agua 6:7:3 v/v

E: Butanol/ac. acético/agua 4:1:5 v/v

F: Cloroformo/metanol/agua 65:25:4 v/v

G: Cloroformo /metanol 30/1 v/v

H: Ac. acético 15%

J: Butanol/hidroxido amónico 3, $5 \cdot 10^{-3}$ M/eter sulfurico 10/10/1 v/v

Lípidos. Esteroides Aislados De Raíz De Cebada

5 grs. de lípidos extraídos con benceno de raíces de cebada, desengrasadas con éter de petróleo, se cromatografiaron en columna de sílica gel 100/200 mesh de Koch-Light suspendida en benceno (40 x 25 cm. de Ø). Se eluyó con benceno y después con benceno/cloroformo 90:10 obteniéndose una fracción que en capa fina dió el

desarrollo que se indica, eluida con cloroformo /metanol 30:1 v/v



.82



.79



.67



.57



.27

1 es fluorescente, verde; los demás colores aparecen después de pulverizar con ac. sulfúrico/etanol y calentar durante 20 minutos a 110°C. siendo de mayor intensidad la mancha de Rf .57 de color morado, que separada por cromatografía en capa fina preparativa en banda y cristalizada en metanol da unos cristales blancos en agujas de punto de fusión 136°C

Su poder rotatorio es $[\alpha] = -33,08$

Derivado acetilado: cristales blancos

P.F. 124 - 125°C

$[\alpha] = -35,3$

Derivado benzoilado: cristales blancos

P.F. 135°C

$[\alpha] = -10,89$

Actividad enzimática del purificado cromatográficamente en
Sephadex G-200

La purificación del apoenzima se llevó a cabo en columnas de las mismas características de las anteriores, cargadas con Sephadex G-200

Columna A: cuya muestra es la primera fracción activa de la columna de Sephadex G-50

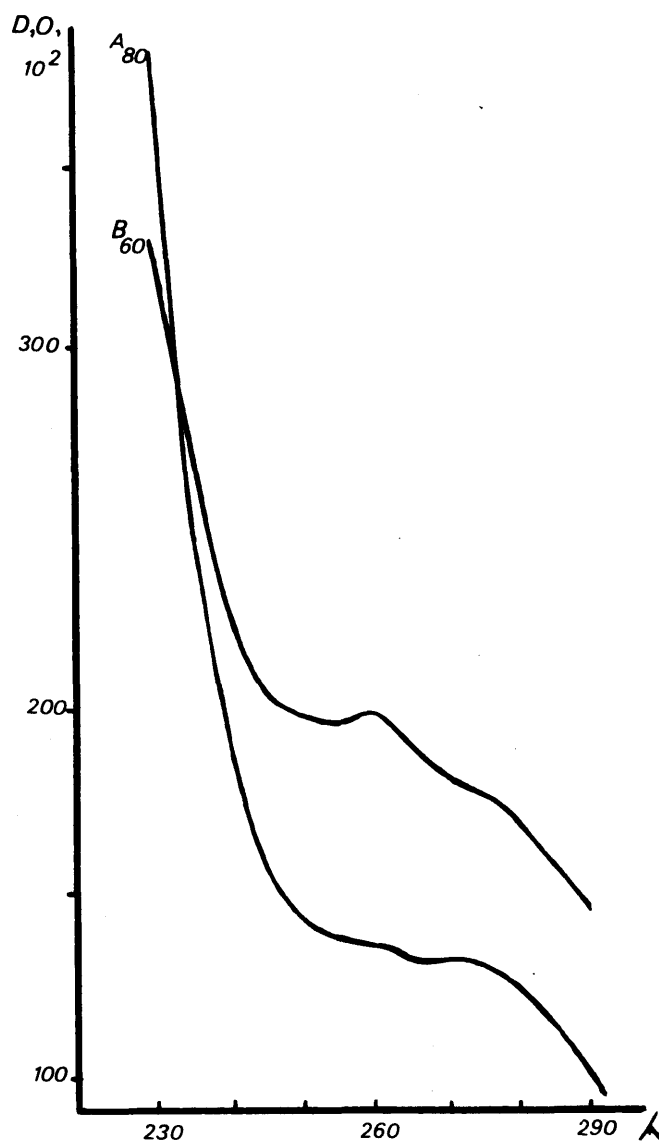
Columna B: cuya muestra es la segunda fracción activa de la columna de Sephadex G-50

Columna A R. Cebada						
Eluido	D.O.			Peroxid.	Act. AIA oxidasa	
ml.	260 mμ	280 mμ	Fenoles	430 mμ	10 min.	30 min.
10	.127	.103	.050	—	—	—
20	.122	.098	.035	—	—	—
30	.092	.074	.215	.093	50	51
40	.620	.523	.590	.135	48 ₅	45
50	.477	.422	.340	.175	44 ₅	29
60	.180	.160	.290	.270	28 ₅	08 ₅
70	.216	.200	.430	.330	135	07 ₅
80	.155	.155	.235	.300	10 ₅	07 ₅
90	.098	.090	.133	.230	35 ₅	15 ₅
100	.152	.120	.098	.150	47 ₅	39 ₅
110	.153	.118	.083	.111	48 ₅	47 ₅
120	.090	.070	.080	—	—	—
Columna A R. Avena						
Eluido	D O			Peroxid.	Act. AIA oxidasa	
ml.	260 mμ	280 mμ	Fenoles	430 mμ	10 min.	30 min.
10	.059	.060	.050	—	—	—
20	.025	.026	.043	—	—	—
30	.078	.069	.073	.275	45	44
40	1.500	1.270	.620	.313	40	39 ₅
50	.775	.627	.410	.310	40 ₅	39
60	.095	.085	.133	.313	41 ₅	41 ₃
70	.078	.070	.133	.322	41	40 ₇
80	.071	.061	.138	.343	43	38
90	.058	.050	.105	.335	42 ₅	39 ₈
100	.088	.064	.160	.340	43 ₈	43
110	.093	.068	.190	.350	44 ₅	44 ₅
120	.056	.037	.130	.335	42	44 ₅

Columna B R, Cebada						
Eluido	D.O.			Peroxid	Act AIA oxidasa	
ml	260 m μ	280 m μ	Fenoles	430 m μ	10 min	30 min
10	.051	.042	.043	—	—	—
20	.003	.000	.050	—	—	—
30	.144	.120	.100	.137	43 ₅	44
40	.850	.720	.485	.187	40	20 ₅
50	.520	.453	.345	.225	31	08 ₇
60	.525	.453	.190	.300	14 ₃	07 ₇
70	.066	.074	.195	.260	20	08 ₅
80	.052	.059	.180	.230	37	23 ₇
90	.017	.025	.145	.183	42 ₅	37
100	.027	.028	.185	.148	44 ₅	43
110	.030	.034	.153	.165	45	42 ₅
120	.000	.000	.063	—	—	—
Columna B R, Avena						
Eluido	D.O.			Peroxid	Act AIA oxidasa	
ml	260 m μ	280 m μ	Fenoles	430 m μ	10 min	30 min
10	.035	.027	.025	—	—	—
20	.027	.023	.015	—	—	—
30	.084	.066	.040	.125	42 ₅	44 ₅
40	1.450	1.130	.585	.145	45 ₅	45
50	1.060	.858	.540	.150	44 ₅	44 ₅
60	.137	.126	.133	.150	43 ₅	43 ₅
70	.196	.184	.165	.168	43	41
80	.154	.158	.188	.195	38 ₅	35
90	.146	.131	.168	.200	39	36
100	.180	.137	.190	.148	40	39 ₃
110	.440	.305	.380	.130	39 ₅	38 ₅
120	.590	.395	.500	.120	40 ₈	39 ₃

Espectro U.V. de las fracciones más activas de las columnas
A y B de raíz de cebada. se presentan en D.O.

λ m μ	A_{80}	B_{60}
230	.381	.330
235	.253	.272
240	.185	.232
245	.155	.205
250	.145	.202
255	.138	.198
260	.136	.199
265	.131	.188
270	.133	.180
275	.130	.177
280	.125	.169
285	.110	.158
290	.097	.142



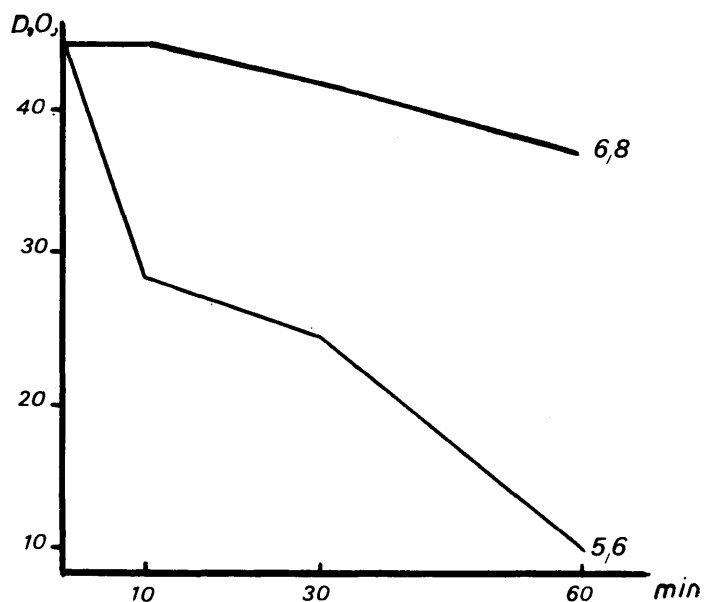
Influencia del pH En La Actividad Del α -amilasa Purificado

pHs óptimos

Probadas las fracciones activas del α -amilasa de raíz de cebada natural purificado en columnas de Sephadex G-50 y G-200, en medios de diferente pH se observó que cuando este último es neutro el α -amilasa pierde actividad

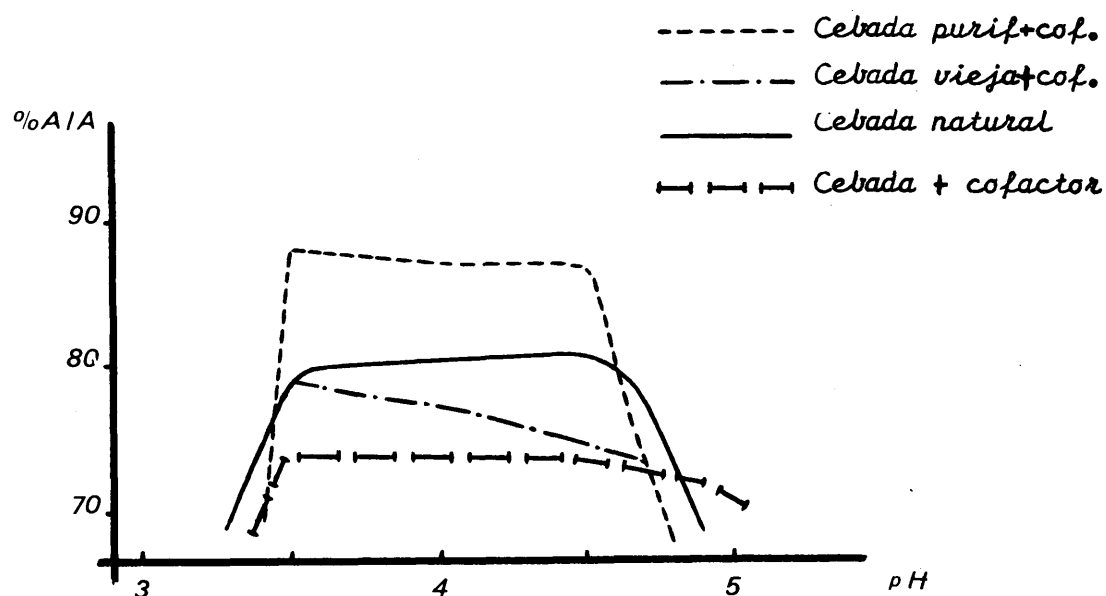
pH	5,6			6,8		
minutos	10	30	60	10	30	60
fracc ⁸⁰ _{G 200}	39	25	10 ₃	45	42 ₅	38 ₅
fracc ⁹⁰ _{G 200}	42 ₅	35 ₅	22	45	43	40
fracc ¹⁰⁰ _{G 200}	43	43	41 ₅	44 ₅	45	43

En el grafico se ha representado solo la fracción más activa, apreciándose claramente la diferencia producida por el pH del medio.

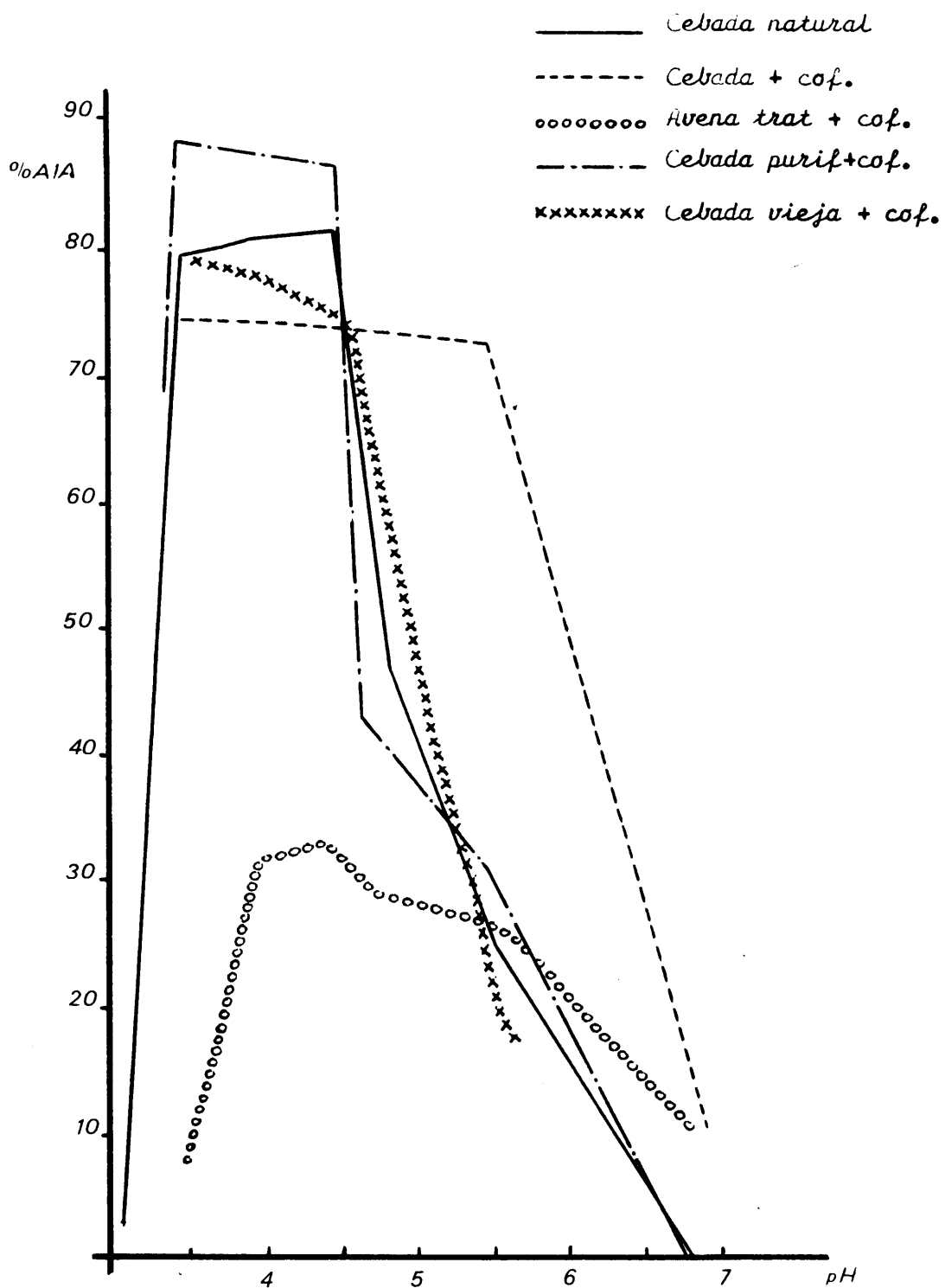


Esto nos indujo a realizar un estudio comparativo entre cebada y avena para extractos crudos y purificados a diferentes pHs sin prestar demasiada atención a los tampones utilizados, observandose que exceptuando la avena natural y su apoenzima purificado, todos los sistemas resultaban activos para un intervalo de pH 3,5 -5,6 con ligeras variaciones de pH optimo. Los resultados se expresan en % de AIA destruido. Se aprecia claramente la influencia de la naturaleza de la solución tamponada pues a pH=4,7 se probaron el tampón acetato y el fosfato obteniendose mejores resultados para el primero.

En el grafico se representa el intervalo de mayor actividad para la cebada.



pH	Cebada natural			Avena natural			Cebada cof			Avena trat cof			C. purificad cof			C. vieja cof			A. purificad cof		
	10	30		10	30		10	30		10	30		10	30		10	30		10	30	
minutos																					
2	-	-		0	0		0	1,4		-	-		0	0		0	0		-	-	
2,5	-	-		0	0		2,5	8		-	-		0	0		0	0		-	-	
3	0	7,5		0	0		15	61,5		0	0		0	0		23	26		0	0	
3,5	79,5	81		-	-		74	77		7	38		88	83,5		79,5	80		1	0	
4	80,5	81,5		-	-		74	75,5		32	83,5		87	83,5		78	79,5		0	1	
4,5	81	79		-	-		73,5	75		33,5	77		87	82		75	76		2	0	
4,7	78	78		0	0		73	74		62,5	87		-	-		74	72,5		1,5	0	
4,7	46,5	74		-	-		72	70		29,5	61		42,5	83,5		70,5	74		-	-	
5,6	24	70,5		0	0		14	20,5		25	53,5		29,5	78,5		20	70		14,5	23	
6,8	0	6,5		-	-		-	-		9,5	26		0	23		-	-		-	-	
7,8	6,5	0		-	-		-	-		3,5	15,5		0	0		-	-		-	-	



Actividades AIA-oxidasa y Peroxidasa: Paralelismo

a) Actividad del apoenzima en diversas condiciones

% AIA destruido			
minutos	10	30	60
Apoenzima Fracc 70 ml G-200	0	2	0
Apoen + Mn^{2+} $5 \cdot 10^{-3} M$	0	0	0
Apoen + pHC $5 \cdot 10^{-4} M$	0	15,5	30,5
Apoen + Mn^{2+} + pHC	29,5	75,5	9

b) Comportamiento de los extractos crudos, purificados y de la Peroxidasa a dos concentraciones, frente a un inhibidor natural como la escopoletina

Actividad AIA-oxidasa									
% AIA destruido									
Escopoletina	$2,5 \cdot 10^{-3} M$			$5 \cdot 10^{-4} M$			$5 \cdot 10^{-5} M$		
minutos	10	30	60	10	30	60	10	30	60
Extr R Cebada	5,5	9	11,5	10,5	19,5	27,5	33	75	85,5
Extr R Cebada _{G-200}	1	1	2	35,5	68	79	22,5	50,5	65,5
Peroxidasa 1mgr/10ml	2	3	8,5	71,5	74,5	74,5	76,5	81	82,5
Peroxidasa 1mgr/100ml	0	0	9	62,5	77,5	83	53,5	72,5	80,5

Los ensayos anteriores se realizaron según el esquema:

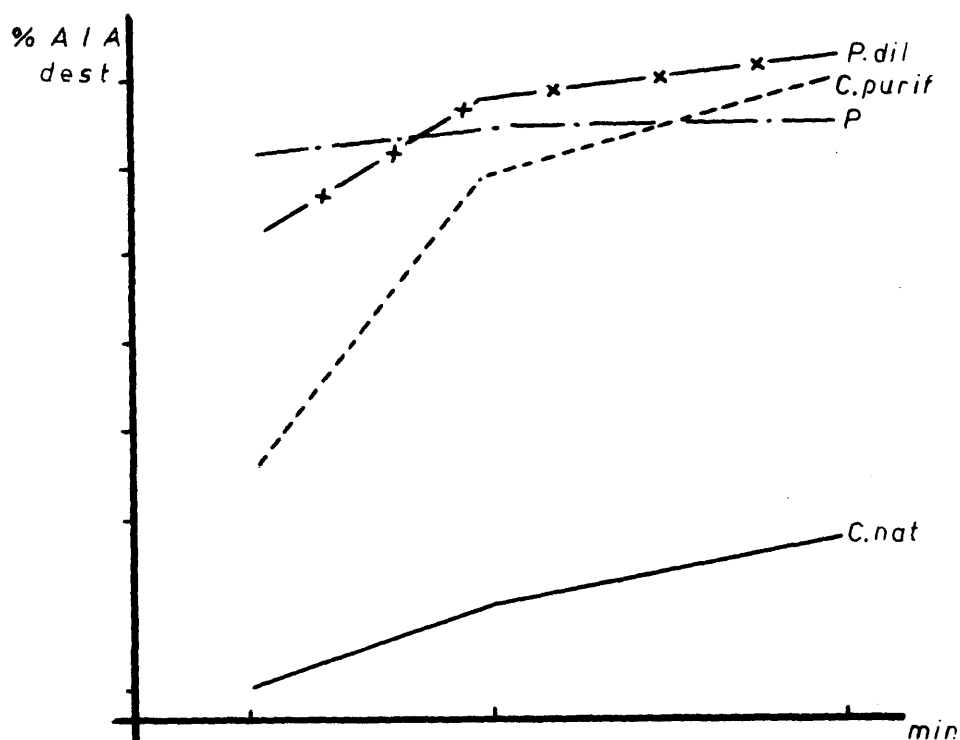
Extracto enzimático ó Peroxidasa de Horseradish tipo I, SIGMA 1,0 ml.

Tampón fosfato 22mM pH=5,6 2,0 ml.

Escopoletina a distintas concentraciones 1,0 ml.

Mn^{2+} $5 \cdot 10^{-3}$ M 0,5 ml.

H₂A 200 γ /ml. 1,5 ml.



En el gráfico, los efectos sobre la escopoletina $5 \cdot 10^{-4}$ M.

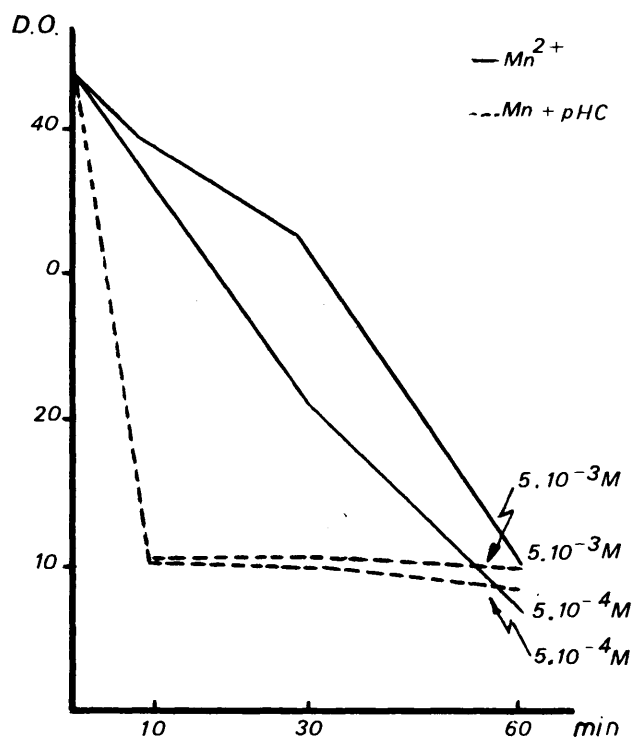
Acción Del Mn^{2+}

a) Efectos de la concentración del Mn^{2+} sobre el apoenzima purificado en Sephadex G-200 del extracto de raíz de cebada, en presencia del cofactor exógeno (pH 5. 10^{-4} M)

% AIA destruido			
minutos	10	30	60
Mn^{2+} $5 \cdot 10^{-3} M$	25	89,5	91,5
Mn^{2+} $5 \cdot 10^{-4} M$	9,5	42	78,5
Mn^{2+} $5 \cdot 10^{-5} M$	1	16	44

b) Acción del Mn^{2+} según su concentración sobre las soluciones de Peroxidasa pura, solo y con adición de cofactor exógeno

Peroxidasa	% AIA destruido			D.O. x 100		
	10	30	60	10	30	60
Mn^{2+} $5 \cdot 10^{-3} M$	10,5	25,5	77	39	32,5	10
Mn^{2+} $5 \cdot 10^{-4} M$	16	49,5	83,5	36,5	22	7,3
pHC + Mn^{2+} $5 \cdot 10^{-3} M$	76	76	76,5	10,5	10,5	10,3
pHC + Mn^{2+} $5 \cdot 10^{-4} M$	76,5	77	80	10,3	10	8,7

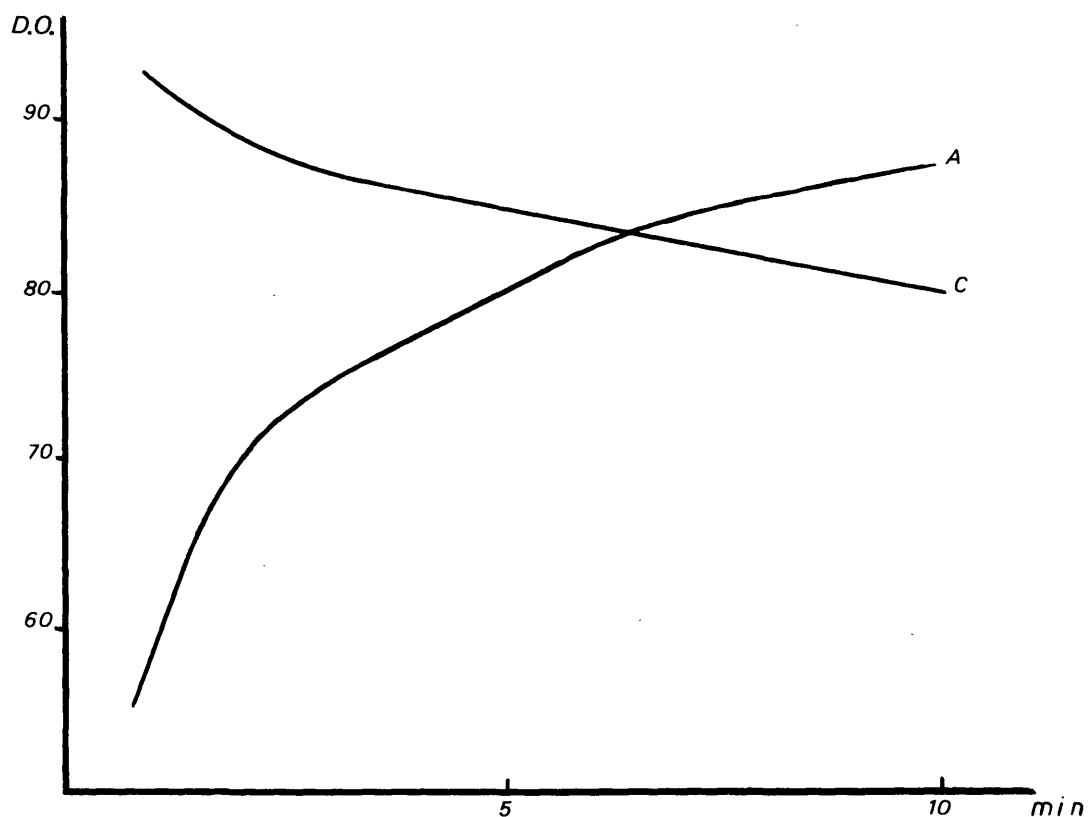


Actividades peroxidasicas y Catalasicas

Como puede apreciarse existe una gran diferencia entre los extractos de raices de cebada y avena, tanto para los extractos naturales como para los tratados con carbón activo aunque más clara para los primeros.

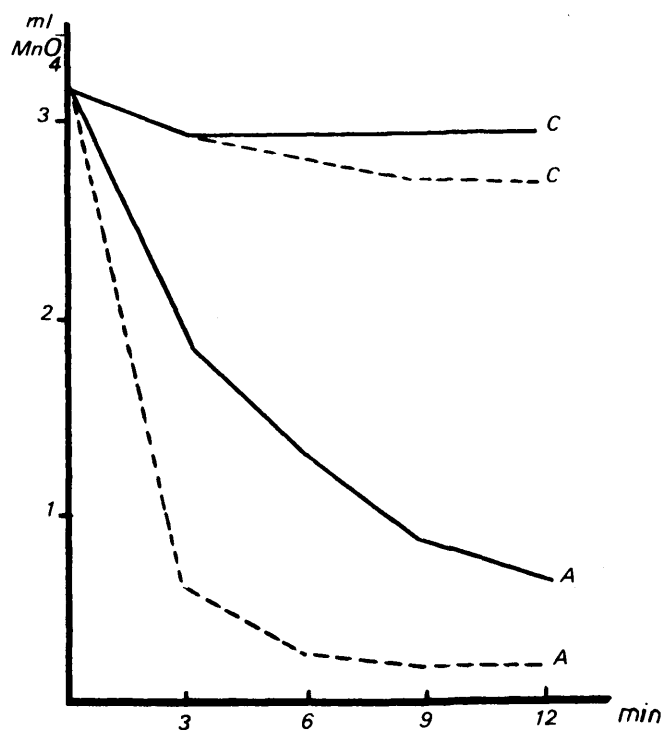
a) Actividad peroxidasica, expresada en medida de evolución del color del producto de oxidación del quayacol, formado por el peroxido.

D.O. \times 100						
minutos	1	2	3	4	5	10
Extr R.Cebad	91	89	86	85	84	80
Extr R.Avena	54	68	73	76	79	87



b) Actividad catalasica medida en ml. gastados de permanganato para la desaparición del peroxido.

minutos	Extracto natural		Extracto tratado	
	C	A	C	A
0	3,2	3,2	3,2	3,2
3	2,95	1,95	2,95	0,60
6	2,90	1,30	2,81	0,29
9	2,90	0,85	2,70	0,20
12	2,90	0,65	2,65	0,20



Especificidad del Sustrato

Se realizaron las pruebas sobre compuestos de estructura retacio
nada con el AIA, siendo el esquema utilizado:

	Probl	C
Extracto 2grs/10ml	1 ml	-
tampon pH=5,6	3,5 "	3 ml
X 200 γ /ml	1,5 "	1 "

Se utilizaron dos métodos de medida. El primero de coloración con el reactivo Salkowsky; las muestras se tomaron a los 10, 30 y 60 minutos y en todos los casos se obtuvieron bajas coloraciones similares a los respectivos controles, a excepción de la Acetamida en donde la coloración es mediana aunque igual al control. Los resulta
dos se expresan en D.O. x 100.

minutos	AIA	Acet
10	23	23
30	10	25
60	8 ₅	27
C	45	26 ₅

El segundo sistema de medida es el espectrofotométrico. Las muestras se tomaron a los sesenta minutos de reacción y se paralizaron (1 ml.) con 4 ml. de etanol, siendo la concentración final de sustrato $1,4 \cdot 10^{-4}$ M. No se apreciaron variaciones importantes en los espectros a excepción del AIA. Los que presentaban alguna pequeña variación como el Indol, Indol-3-propiónico e Indol-3-aldehído, se sometieron a la acción del extracto purificado en columna de Sephadex G-50 y realizados los ensayos según el esquema inicial no se apreciaron diferencias con los controles, en los respectivos espectros.

Los compuestos probados fueron:

Indol, Metil-indol, Indol-3-propiónico, Indol-3-butírico, Indol-3-aldehído, Indol-3-acetamida, Triptamina y Triptofano.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron por el método diferencial, utilizándose para el problema el esquema experimental anterior y como control C el obtenido según:

Extracto diluido 1/6	1 ml.
Alcohol etílico	3,75 ml.
X 200γ/ml.	0,25 ml.

λ m μ	I		AIA		Acet		T		T-NH ₂	
	Probl	C	Probl	C	Probl	C	Probl	C	Probl	C
235	.058	.282	.242	.145	.240	.297	.060	.206	.172	.058
240	.056	.230	.205	.069	.157	.202	.014	.140	.127	.021
245	.072	.193	.200	.051	.146	.175	.013	.131	.134	.028
250	.107	.190	.210	.064	.161	.180	.040	.152	.155	.053
255	.163	.223	.226	.098	.203	.217	.081	.191	.198	.110
260	.220	.272	.232	.151	.258	.269	.136	.240	.250	.169
265	.264	.311	.242	.205	.315	.321	.180	.290	.300	.227
270	.282	.333	.244	.250	.362	.363	.225	.330	.338	.271
275	.273	.321	.238	.270	.375	.268	.240	.349	.352	.290
280	.283	.324	.243	.302	.392	.381	.262	.368	.369	.313
285	.195	.228	.191	.253	.324	.307	.215	.317	.312	.252

I: Indol

AIA: Indol-3-acético

Acet: Indol-3-acetamida

T: Triptofano

T-NH: Triptamina
2

λ m μ	MI		1-3 Aldeh		AIP		AIB	
	Probl	C	Probl	C	Probl	C	Probl	C
240	.187	.111	.810	.685	.294	.152	.272	.160
245	.160	.085	.820	.715	.263	.124	.230	.130
250	.172	.100	.700	.598	.255	.128	.227	.137
255	.199	.130	.693	.598	.268	.164	.260	.175
260	.240	.179	.720	.633	.299	.198	.290	.213
265	.288	.233	.655	.573	.330	.235	.322	.248
270	.330	.277	.483	.405	.368	.278	.362	.290
275	.353	.305	.478	.383	.384	.302	.387	.315
280	.373	.320	.540	.442	.405	.317	.400	.338
285	.348	.300	.620	.530	.388	.303	.384	.318
290	.320	.272	.715	.625	.370	.278	.364	.300
295	.214	.164	.770	.693	.269	.173	.262	.197
300	.121	.072	.760	.688	.188	.094	.163	.104

MI: Indol-3-metil

3-Ald: Indol-3-aldehido

AIB: Indol-3-butírico

AIP: Indol-3-propiónico

Actividad AIA-oxidasa observada espectrofotometricamente

a) Actividad del apoenzima de cebada purificado en columna de Sephadex G-50

El esquema experimental seguido fue:

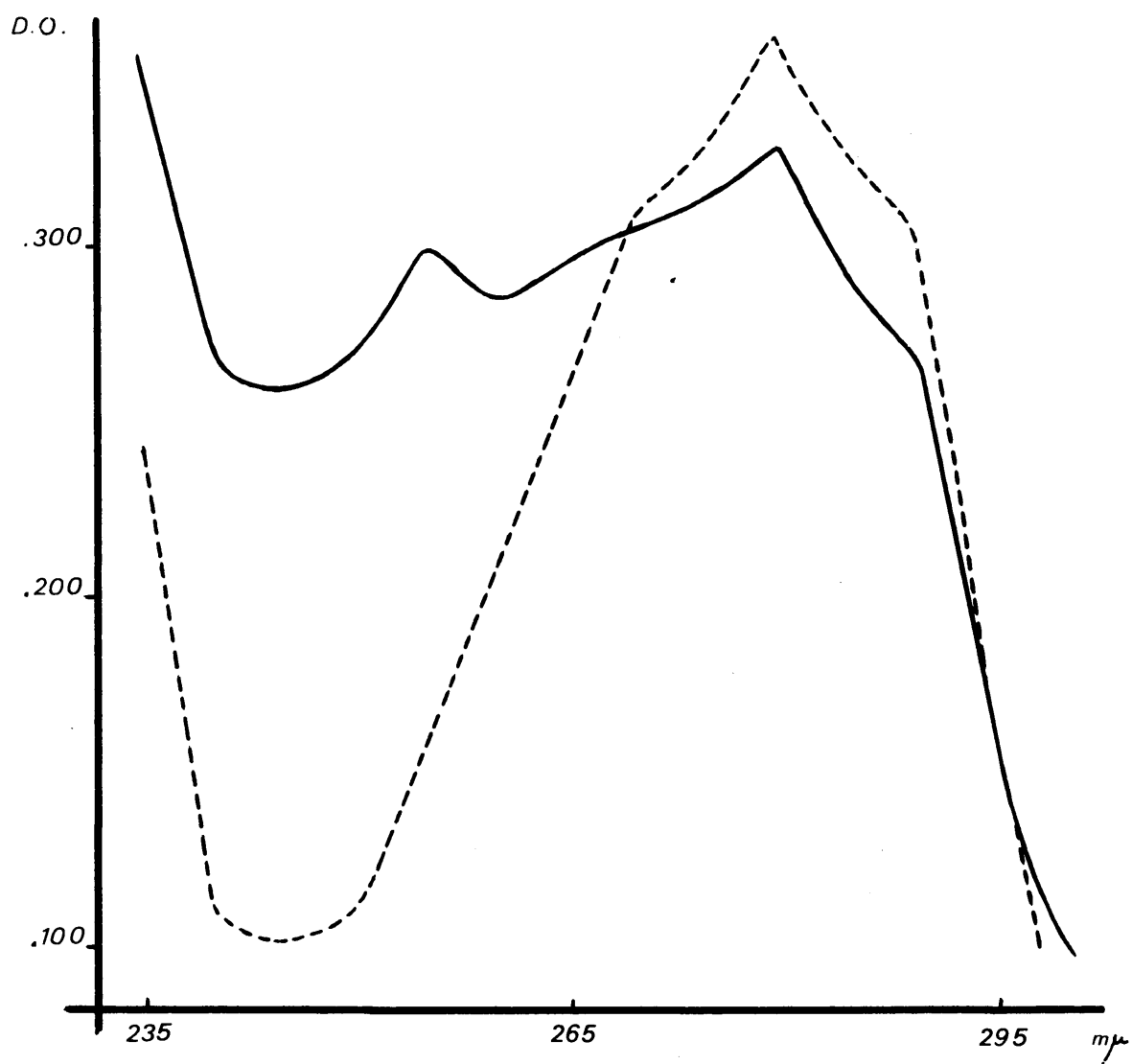
Extr. R. Cebada G-50 1 ml.

Tampón pH=5,6 22 mM de fosfato 3,5 ml.

AIA 200 γ /ml. 1,5 ml.

Las medidas se realizaron por el método diferencial: 1 ml. de la mezcla problema o del blanco, se llevó sobre 3 ml. de alch. etílico + 1 ml. de agua destilada. Las muestras se tomaron a los sesenta minutos.

$\lambda_{m\mu}$	AIA		$\lambda_{m\mu}$	AIA	
	Probl	C		Probl	C
235	.355	.245	270	.306	.308
240	.263	.110	275	.313	.328
245	.258	.100	280	.326	.360
250	.268	.108	285	.291	.323
255	.299	.155	290	.265	.305
260	.283	.204	295	.158	.175
265	.295	.255	300	.095	.088



b) Observación de la velocidad de la reacción enzimática

La destrucción oxidativa del NAD observada espectrofotométricamente se realizó según el esquema:

1,0 ml. apoenzima aislado en columna de Sephadex G-200

0,5 ml. NAD $2, 8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

1,0 ml. cofactor exógeno (pH $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$)

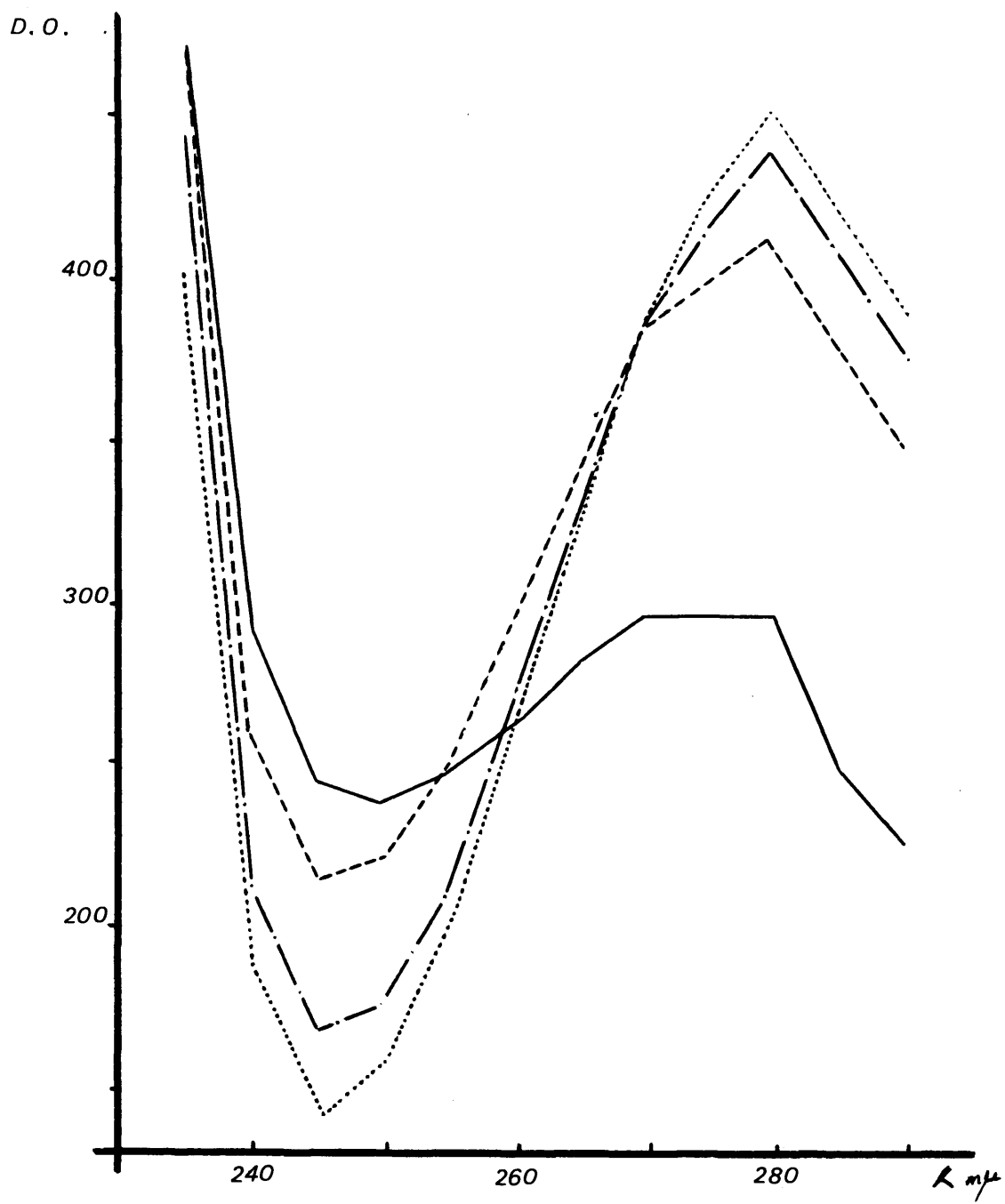
0,5 ml. activador exógeno ($\text{Mn}^{2+} 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)

1,0 ml. tampón fosfatos 22 mM pH = 5,6

La concentración final de NAD es $7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

Se tomaron muestras a los 0, 5, 15 y 30 minutos.

λ_{mp}	0	5	15	30	λ_{mp}	0	5	15	30
235	.405	.443	.472	.472	265	.329	.328	.338	.282
240	.185	.208	.257	.291	270	.384	.382	.382	.290
245	.143	.167	.214	.244	275	.423	.413	.395	.294
250	.158	.175	.220	.238	280	.450	.438	.410	.295
255	.200	.208	.245	.246	285	.420	.408	.375	.246
260	.261	.269	.291	.262	290	.388	.377	.346	.223



Cinética De La Reacción Enzimática

a) Cinética de la reacción enzimática en raíz troceada.

Se expresa en $\mu\text{l.}$ de O_2 consumido medido en el Warburg y en AIA destruido en γ según la reacción de coloración de Salkowsky. El esquema seguido para la reacción en el Warburg es:

raíz de cebada troceada $\approx 0,5 \text{ mm.}$ 0,2 grs.

tampón pH=5,6 22 mM 1,0 ml.

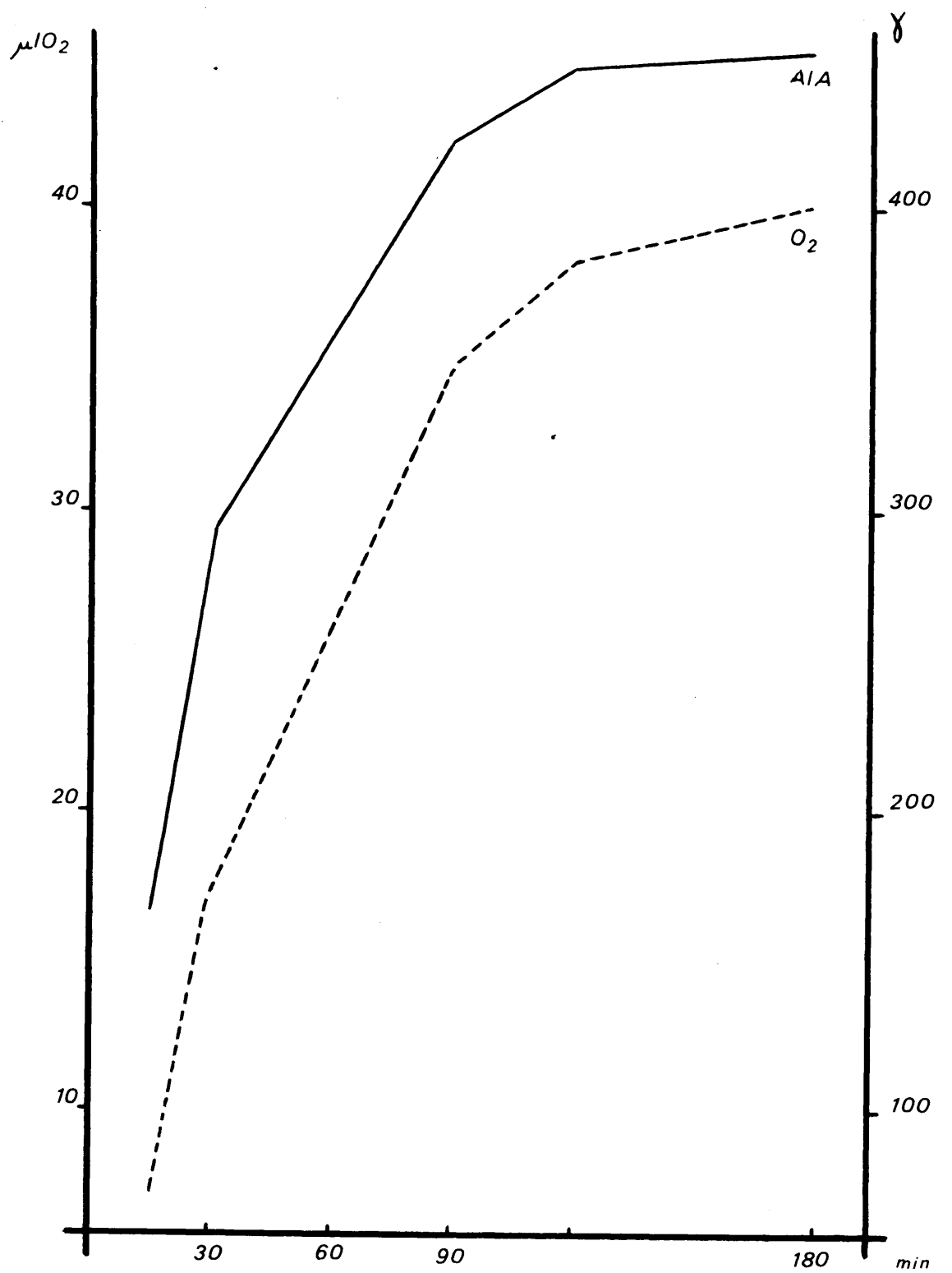
sol. antibioticos 0,25 "

AIA 500 $\gamma/\text{ml.}$ 1,0 "

En el grafico se representan $\mu\text{l.}$ de O_2 consumido y paralelamente γ de AIA destruido.

minutos	AIA destruido		O_2 consumido		AIA/O_2
	γ	moles	$\mu\text{l.}$	moles	
15	165	$0,942 \cdot 10^{-6}$	7,2	$0,32 \cdot 10^{-6}$	2,9
30	293	$1,68 \cdot 10^{-6}$	17,2	$0,76 \cdot 10^{-6}$	2,2
60	358	$2,04 \cdot 10^{-6}$	25,9	$1,15 \cdot 10^{-6}$	1,77
90	423	$2,42 \cdot 10^{-6}$	35,0	$1,56 \cdot 10^{-6}$	1,55
120	448	$2,55 \cdot 10^{-6}$	38,4	$1,71 \cdot 10^{-6}$	1,59
180	453	$2,58 \cdot 10^{-6}$	40,3	$1,79 \cdot 10^{-6}$	1,44

Los valores de oxígeno consumido están corregidos con los valores de O_2 consumido por la raíz en las mismas condiciones de experimentación.



b) Cinética del extracto purificado en Sephadex G-50

Se calculó la cinética del apoenzima obtenido de la fracción 60 ml. de la columna de extracto natural de cebada, según el esquema:

extracto 1 ml.

p-HC $5 \cdot 10^{-4}$ M 1 ml.

Mn²⁺ $5 \cdot 10^{-3}$ M 0,5 ml.

AJA 1 ml.

Las soluciones mezcla de los ensayos tienen las siguientes concentraciones de AJA:

$2,8 \cdot 10^{-3}$ M

$1,42 \cdot 10^{-3}$ M

$0,28 \cdot 10^{-3}$ M

$0,14 \cdot 10^{-3}$ M

Las muestras están tomadas a los cinco minutos de reacción

El método seguido es el espectrofotométrico

1) Cálculo por el ϵ

$$Abs = \epsilon \cdot l \cdot c$$

$D.O. \times 10^{-3}$	
0 min	5 min
316	305
175	168
311	260
260	154

Cálculo

Concentración de medida $\times 10^{-3} M$		Factor de dilución	Concentración de la mezcla $\times 10^{-3} M$	
0 min	5 min		0 min	5 min
0,046	0,044	60	2,76	2,64
0,023	0,022	60	1,38	1,32
0,047	0,039	6	0,282	0,234
0,023	0,014	6	0,138	0,084

2) Cálculo por \log (Abs)

Conc. iniciales $\times 10^{-3} M$	Factor de dilucion	$D.O. \times 10^{-3}$			
		Deter I		Deter II	
		0 min	5 min	0 min	5 min
2,8	1/60	.316	.305	.364	.336
1,42	1/60	.175	.168	.192	.180
0,28	1/6	.311	.260	.279	.228
0,14 ₂	1/6	.260	.154	.140	.094

Determinación de F

$$\log (Abs)_0 = \log E + \log 1 + \log c$$

$$\log (Abs)_5 = \log E + \log 1 + \log c + \log F$$

$\log (Abs)$		$\log F$	F
0 min	5 min		
$\bar{1},4996$	$\bar{1},48430$	$\bar{1},98461$	0,965
$\bar{1},24304$	$\bar{1},22531$	$\bar{1},98227$	0,960
$\bar{1},49276$	$\bar{1},41497$	$\bar{1},92221$	0,836
$\bar{1},41497$	$\bar{1},18752$	$\bar{1},77255$	0,592
$\bar{1},56110$	$\bar{1},52634$	$\bar{1},96524$	0,943
$\bar{1},28330$	$\bar{1},25527$	$\bar{1},97197$	0,937
$\bar{1},44560$	$\bar{1},35793$	$\bar{1},91233$	0,817
$\bar{1},14613$	$\bar{2},97313$	$\bar{1},82700$	0,672

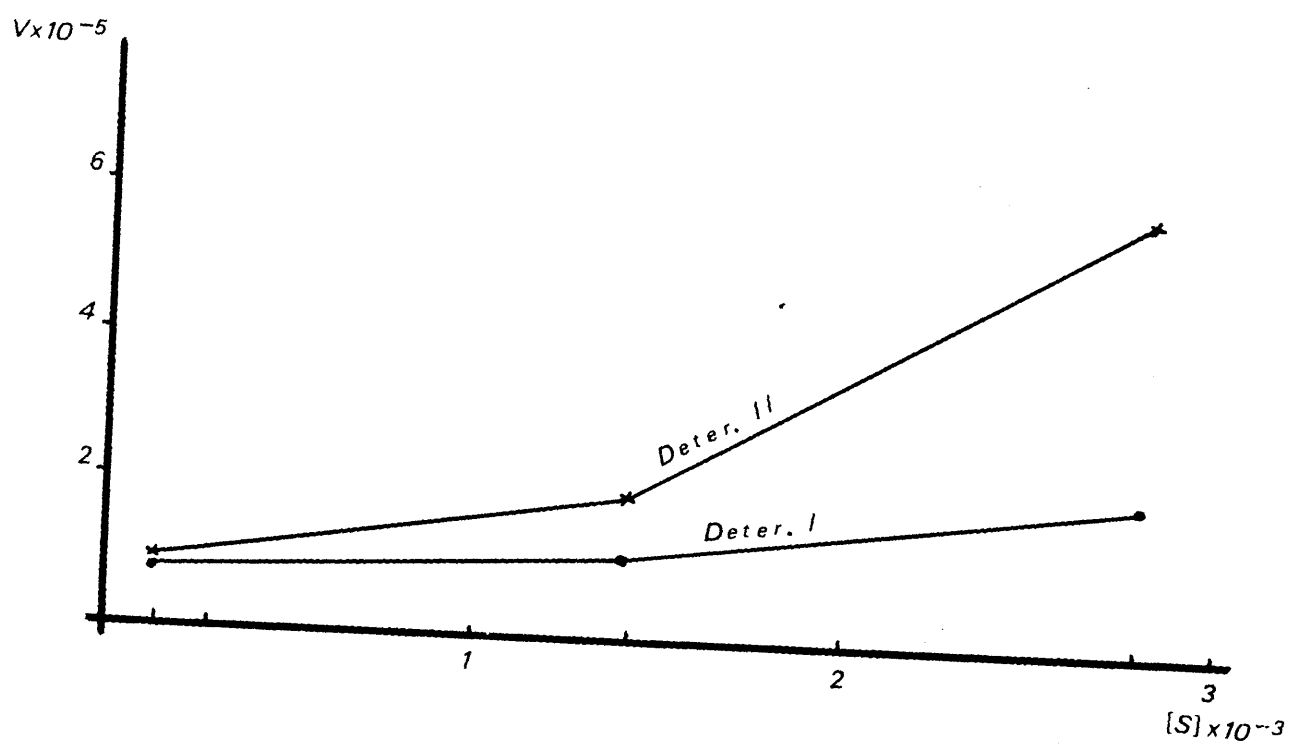
Cálculo

Concentracion de medida $\times 1^{-4}M$				Concentracion de mezcla $\times 1^{-3}M$		
c'_0	$\times F$	c'		c_0	c	
0,46 ₆		0,44	0,43	2,8	2,69	2,5
0,23 ₆		0,226	0,220	1,42	1,36	1,32
0,47		0,384	0,380	0,28	0,23	0,22 ₈
0,23 ₆		0,13 ₉	0,158	0,14 ₂	0,083 ₉	0,095

$$v = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{c_0 - c_5}{-5}$$

$V \times 10^{-5}$		$S \times 10^{-3}$	$1/V \times 10^{-5}$		$1/S \times 10^3$
2,2	6	2,8	0,45	0,16	0,357
1,2	2	1,42	0,83	0,5	0,704
1	1,04	0,28	1	0,96	3,571
0,76	0,94	0,142	0,38	1,06	7,042

La cinética realizada con este mismo apoenzima purificado en Sephadex G-200, es de un orden similar al expresado en estas tablas



Destrucción del AJA Por Irradiación Con Luz U. V.

a) En ausencia de antioxidante

4,44 ml. tampón fosfato 22 mM pH=5,6

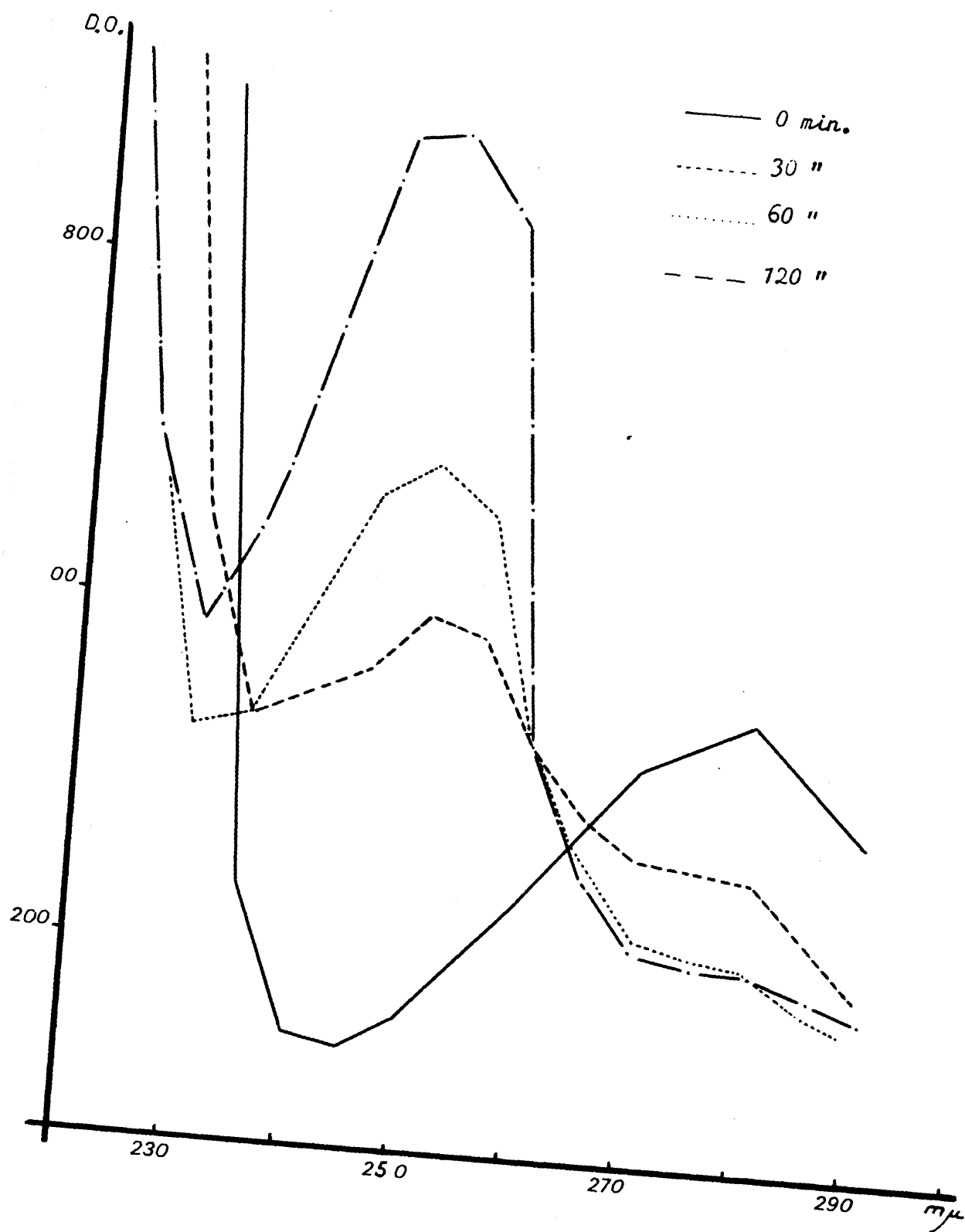
0,06 ml. riboflavina 10^{-4} M

1,5 ml. AJA $2,8 \cdot 10^{-4}$ M

Se irradió durante 30, 60 y 120 minutos a 12 cm, del foco de luz.*
La concentración final de AJA es $7 \cdot 10^{-5}$ M y la de riboflavina 10^{-6} M

$\lambda_{m\mu}$	0 min	30 min	60 min	120 min	$\lambda_{m\mu}$	0 min	30 min	60 min	120 min
225	1,100	1,065	,640	,637	260	,262	,392	,392	,388
230	,955	,579	,388	,478	265	,325	,335	,292	,279
235	,252	,403	,402	,575	270	,380	,301	,233	,219
240	,129	,425	,501	,745	275	,405	,296	,217	,208
245	,121	,478	,605	,920	280	,427	,287	,211	,209
250	,146	,504	,633	,937	285	,375	,244	,179	,192
255	,200	,488	,595	,860	290	,337	,187	,134	,167

* Lámpara de Wood. Phillips 125 w.



b) Destrucción del AJA por la luz u. V. en presencia de antioxidantes y otros compuestos. El esquema es el siguiente:

3,44 ml. tampón fosfato 22 mM pH=5,6

1,0 ml. antioxidante $5 \cdot 10^{-3}$ M

0,06 ml. riboflavina 10^{-4} M

1,5 ml. AJA $2,8 \cdot 10^{-4}$ M

* indica las muestras que hubo de diluir: 1 ml. en 2,5 ml. de tampón para medir en el espectrofotometro, por exigirlo la abertura del diafragma

El tiempo de exposición a la luz u. V. es de 30 minutos.

$\lambda_{m\mu}$	oHF^*	mHF	pHF^*	pBQ	P	F	MH
235	.195	.317		—	—	.280	
240	.125	.240	.107	—	—	.264	
245	.107	.243	.058	—	—	.307	
250	.117	.268	.044	—	.182	.334	.555
255	.125	.303	.060	—	.224	.346	.465
260	.125	.326	.079	—	—	.317	.367
265	.128	.355	.099	.309	—	.300	.297
270	.135	—	.115	.335	—	.287	.245
275	.136	—	.124	.365	.411	.294	.227
280	.144	.385	.131	.386	.420	.296	.211
285	.129	.36	.095	.337	.375	.258	.174
290	.108	.317	.043	.290	.341	.209	.121
295	.095	.186	—	.148	.194	.104	.105
300		.105	—	.068	.103	.046	.067

oHF : *o*-dihidroxifenol

P : pirogalol

mHF : *m*-dihidroxifenol

F : fenol

pHF : *p*-dihidroxifenol

MH : maleicohidrazida

pBQ : *p*-benzoquinona

destrucción del AIA Por medio De La NBrSuccinimida

a) Esquema experimental en ausencia de antioxidante:

3 ml. tampón fosfato 22 ml pH=5,6

1 ml. AIA $1,12 \cdot 10^{-3}$ M (200 γ /ml.)

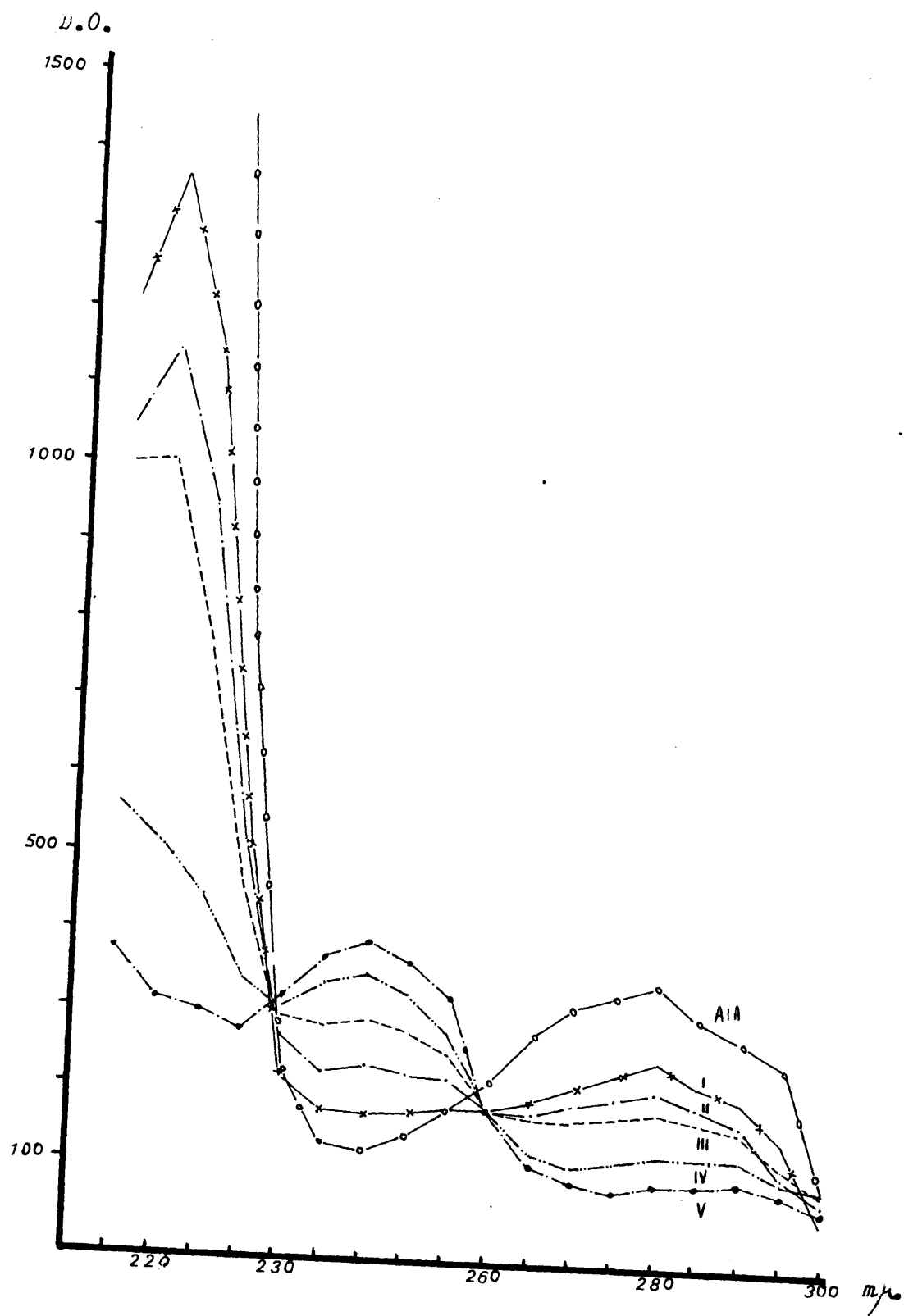
0,1-0,5 ml. NBrsuccinimida $5 \cdot 10^{-3}$ M

A los quince minutos de reacción 1 ml. de estas muestras se llevan sobre 4 ml. de tampón y se miden espectrofotométricamente por el método diferencial

Las relaciones de concentración entre AIA y NBrS son:

Determinac.	Conc final AIA	Conc final NBrS	NBrS/AIA
I	$2,70 \cdot 10^{-4}$ M	$1,20 \cdot 10^{-4}$ M	0,44
II	$2,66 \cdot 10^{-4}$ M	$2,38 \cdot 10^{-4}$ M	0,89
III	$2,60 \cdot 10^{-4}$ M	$3,48 \cdot 10^{-4}$ M	1,30
IV	$2,54 \cdot 10^{-4}$ M	$4,54 \cdot 10^{-4}$ M	1,78
V	$2,48 \cdot 10^{-4}$ M	$5,50 \cdot 10^{-4}$ M	2,23
C	$2,80 \cdot 10^{-4}$ M	—	—

$\lambda_{m\mu}$	A / A	I	II	III	IV	V
215	1.680	1.210	1.050	.900	.561	.388
220	1.900	1.370	1.140	.908	.510	.313
225	1.650	1.150	.950	.765	.447	.300
230	.770	.570	.510	.460	.342	.285
235	.229	.223	.257	.293	.304	.313
240	.134	.166	.227	.284	.331	.368
245	.123	.162	.233	.293	.355	.395
250	.138	.163	.224	.280	.325	.368
255	.155	.171	.216	.258	.282	.315
260	.175	.175	.178	.174	.171	.173
265	.271	.194	.176	.172	.125	.108
270	.312	.215	.189	.171	.111	.086
275	.330	.227	.198	.175	.113	.082
280	.346	.243	.208	.185	.123	.092
285	.305	.218	.192	.175	.123	.094
290	.280	.202	.175	.166	.125	.095
295	.149	.132	.110	.119	.104	.085
300	.074	.064	.069	.085	.085	.071



b) Esquema experimental en presencia de antioxidante u otros compuestos:

3,5 ml. de tampón fosfato 22 ml pH=5,6

1 ml. antioxidante $5 \cdot 10^{-3}$ ml

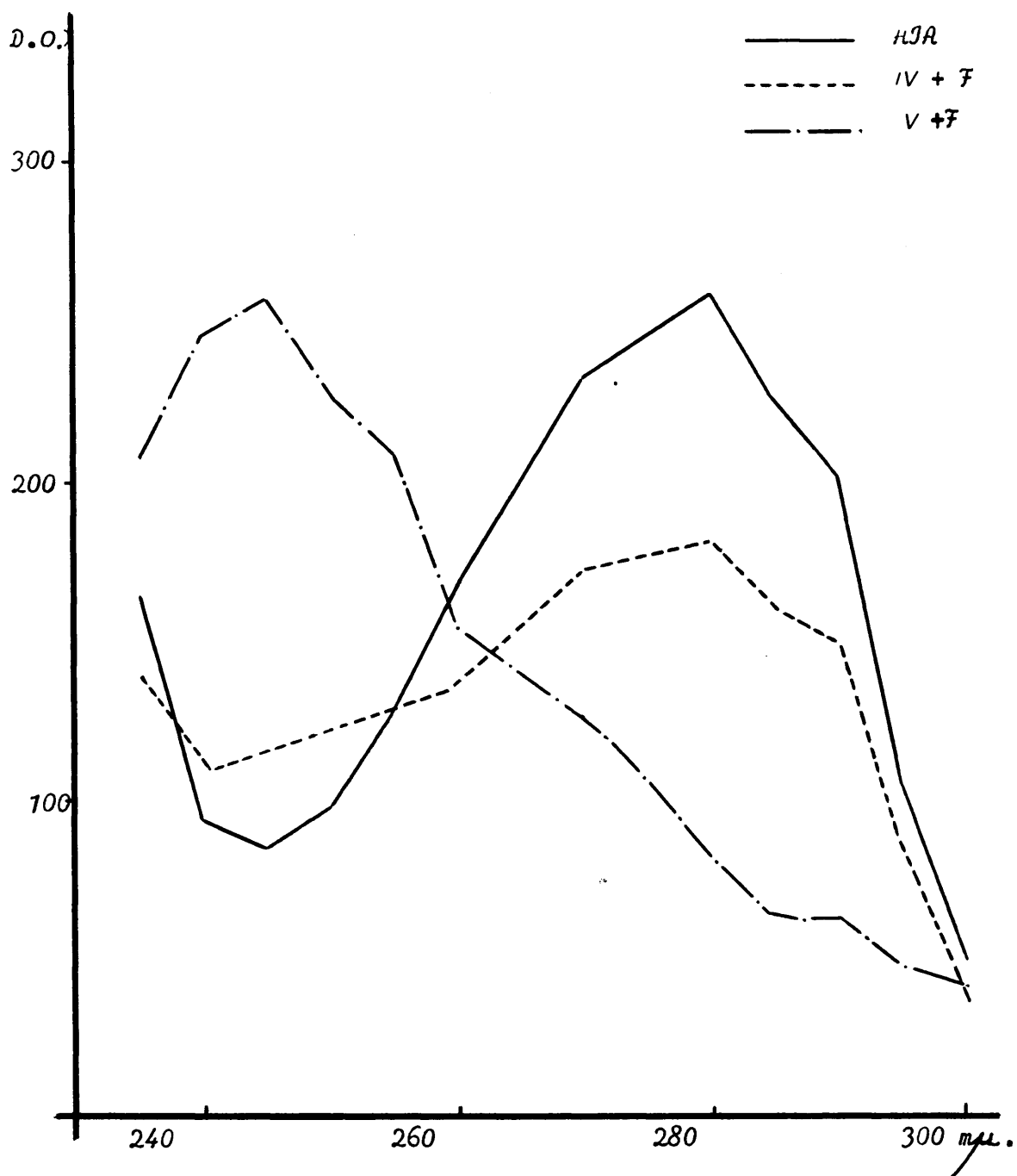
1,5 ml. ASA $1,12 \cdot 10^{-3}$ ml (200 γ /ml.)

0,4-0,5 ml. NBrsuccinimida $5 \cdot 10^{-3}$ ml

A los quince minutos de reacción 1 ml. de estas muestras se llevan sobre 4 ml. de tampón y se miden espectrofotométricamente por el método diferencial. La concentración final de antioxidante es $1,6 \cdot 10^{-4}$ ml.

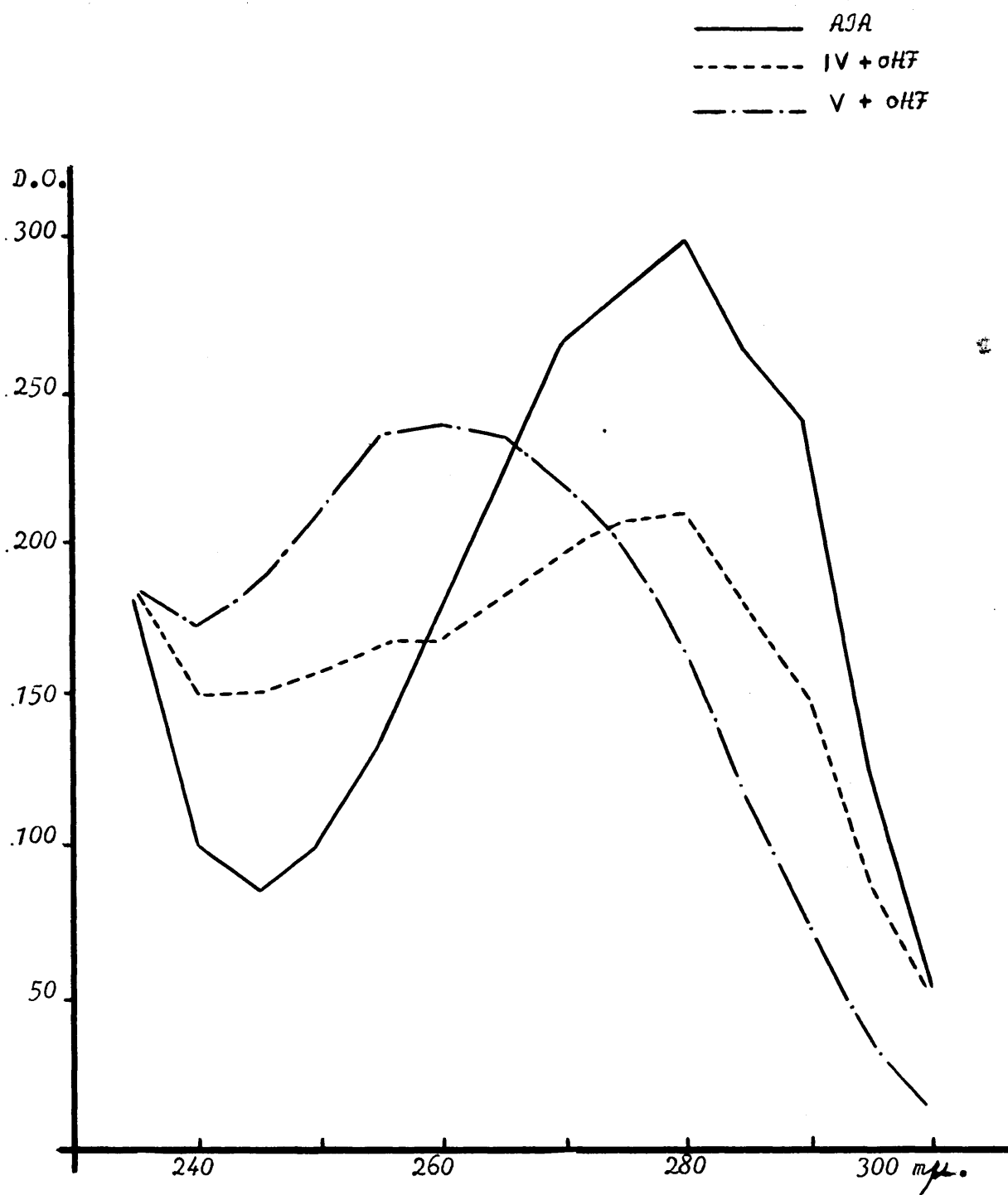
λ m μ	A/A	IV+F	V+F	λ m μ	A/A	IV+F	V+F
235	.165	.140	.208	270	.233	.173	.126
240	.093	.109	.247	275	.247	.177	.106
245	.085	.115	.258	280	.260	.182	.081
250	.098	.122	.227	285	.226	.160	.063
255	.127	.129	.211	290	.202	.150	.062
260	.168	.136	.155	295	.104	.082	.046
265	.202	.154	.140	300	.047	.037	.040

F: fenol



λ $m\mu$	A/A	IV+oHF	V+oHF
235	.179	.183	.185
240	.100	.149	.172
245	.084	.150	.186
250	.100	.156	.210
255	.134	.165	.234
260	.177	.167	.238
265	.223	.181	.234
270	.264	.196	.219
275	.281	.206	.197
280	.299	.208	.164
285	.261	.176	.112
290	.237	.148	.072
295	.120	.085	.033
300	.049	.047	.013

oHF: o-hidroxifenol

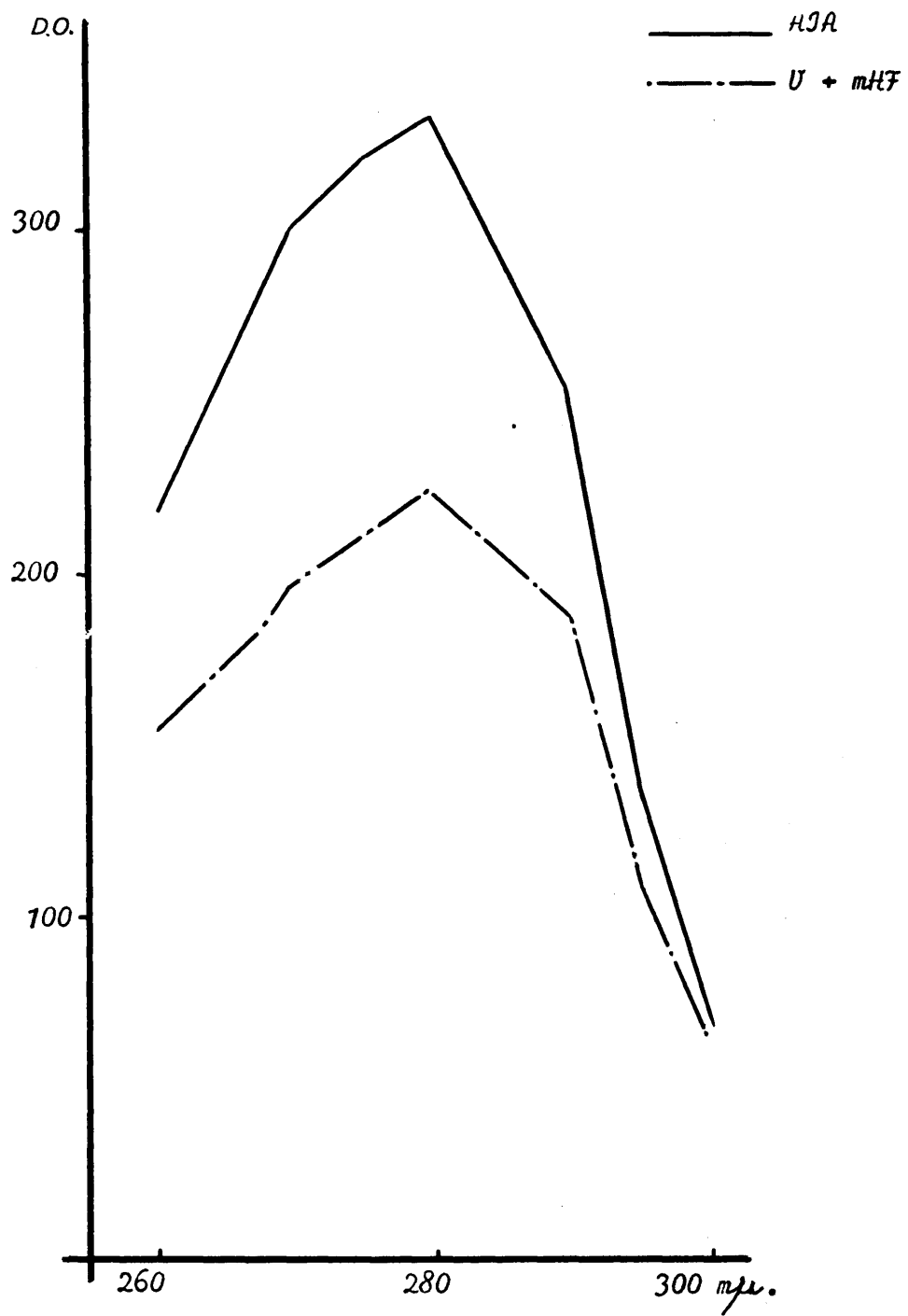


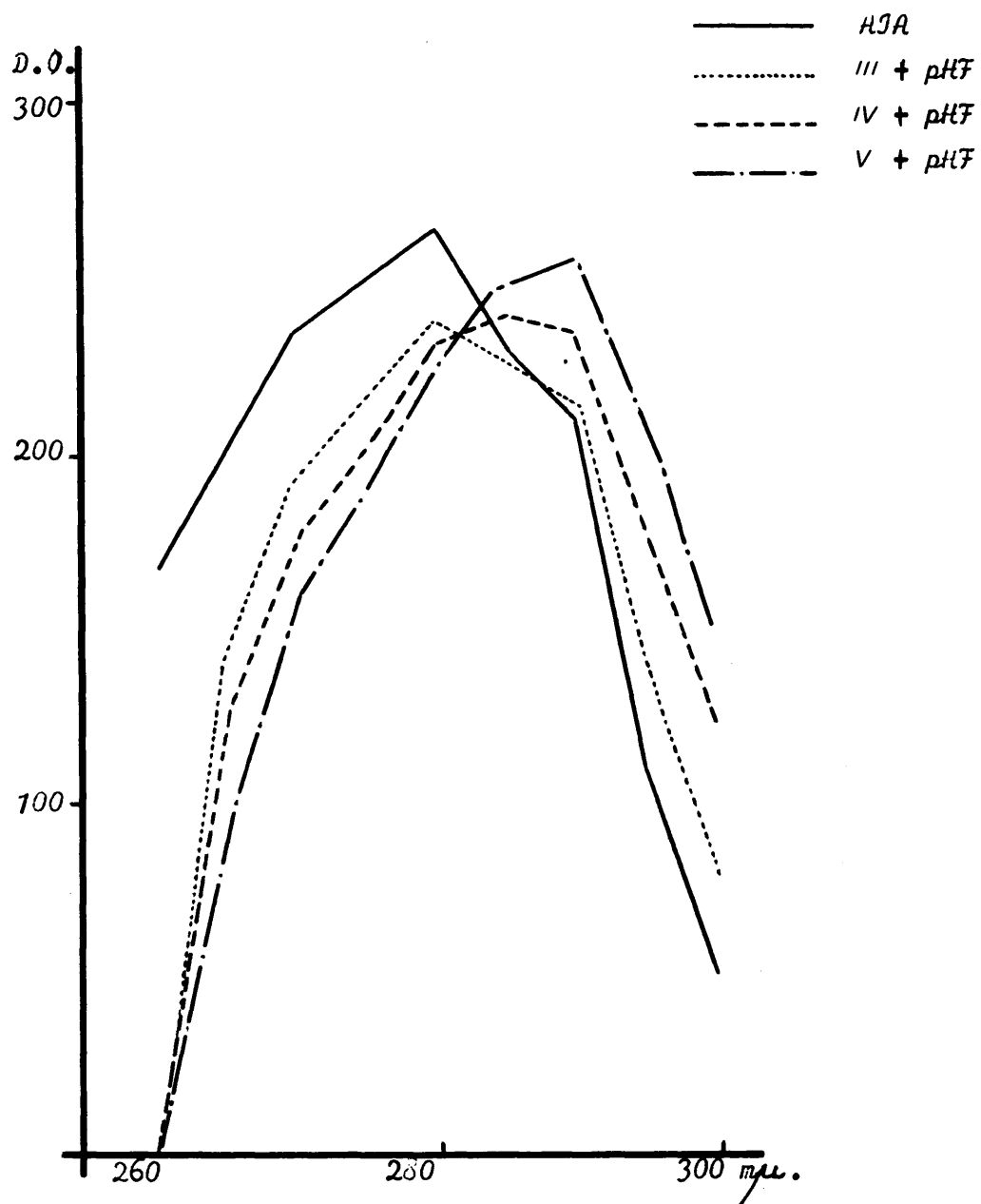
$\lambda_{m\mu}$	A/A	V+mHF	$\lambda_{m\mu}$	A/A	V+mHF
260	.219	.153	285	.292	.206
265	.262	.173	290	.255	.188
270	.303	.197	295	.138	.111
275	.321	.210	300	.070	.063
280	.333	.226			

$\lambda_{m\mu}$	A/A	III+pHF	IV+pHF	V+pHF
260	.166	0	0	0
265	.203	.149	.128	.094
270	.235	.196	.178	.160
275	.250	.218	.202	.191
280	.264	.238	.232	.227
285	.231	.226	.240	.250
290	.211	.214	.235	.256
295	.107	.138	.176	.209
300	.049	.078	.119	.147

mHF: m-hidroxifenol

pHF: p-hidroxifenol



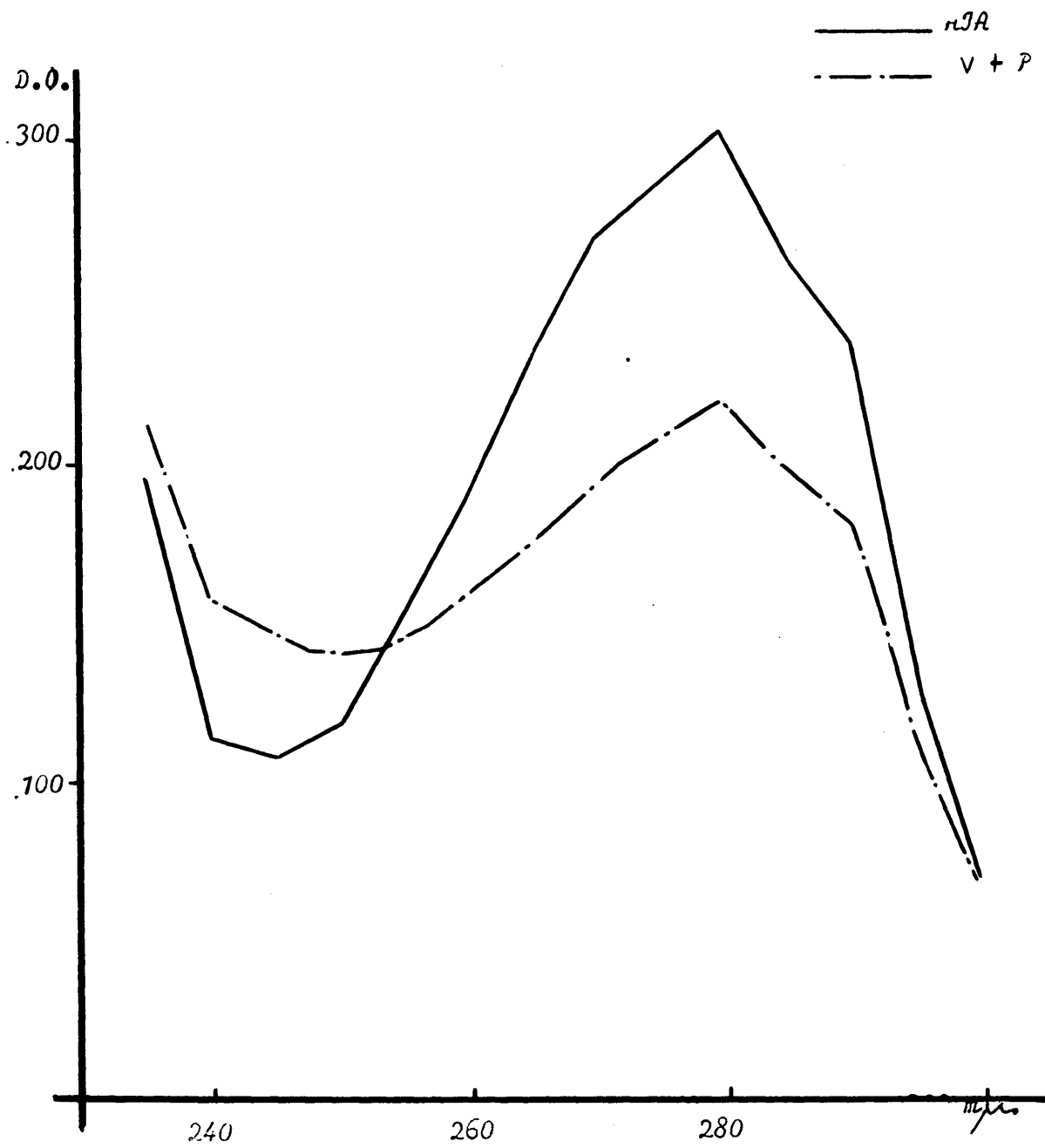


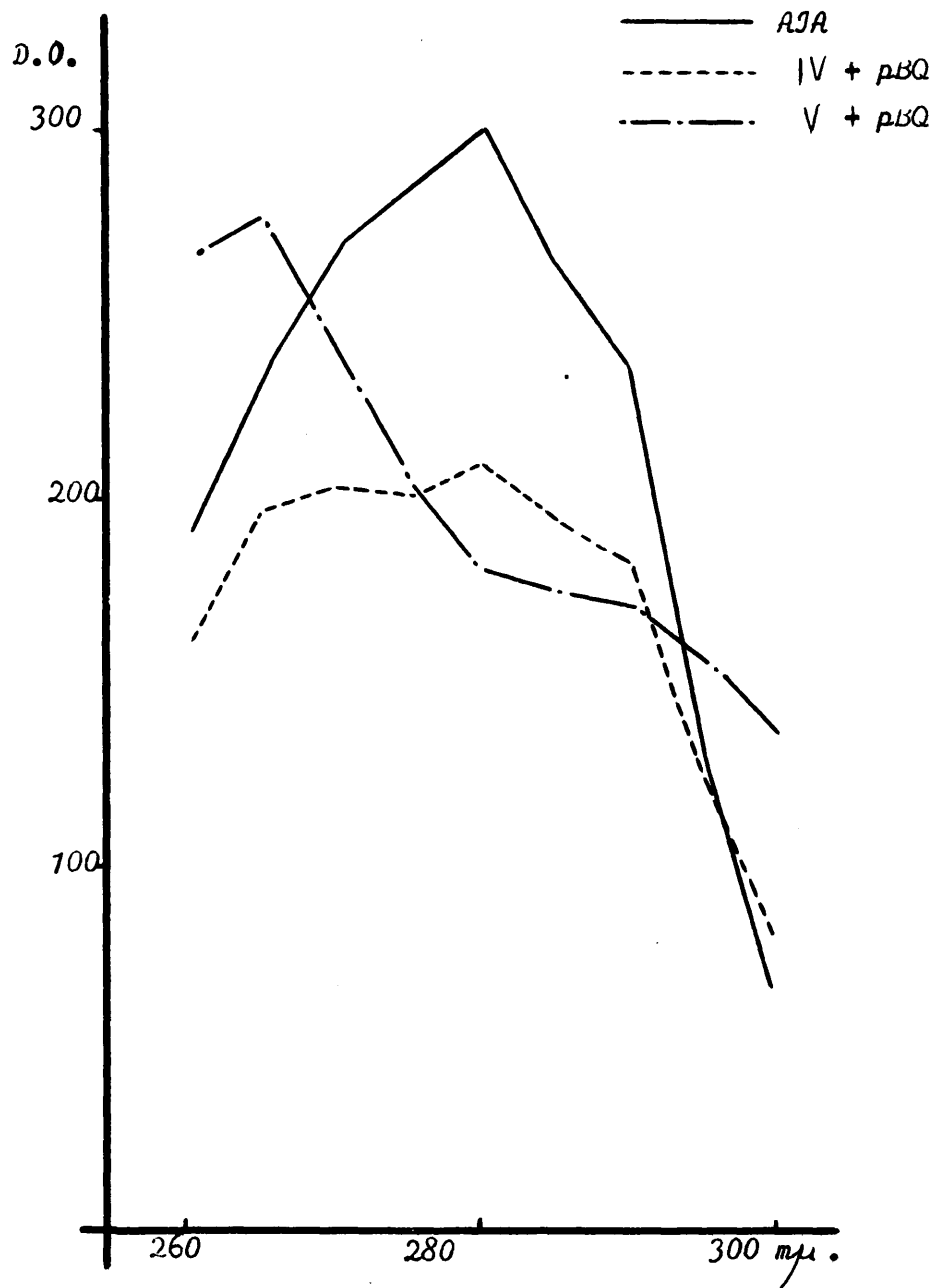
λ $\mu\mu$	A/A	V+mHF	λ $\mu\mu$	A/A	V+mHF
235	.196	.212	270	.269	.193
240	.114	.156	275	.286	.206
245	.108	.144	280	.301	.219
250	.118	.139	285	.264	.196
255	.154	.144	290	.237	.179
260	.190	.158	295	.131	.106
265	.233	.175	300	.067	.062

λ $\mu\mu$	A/A	IV+pBQ	V+pBQ
260	.190	.159	.226
265	.233	.197	.279
270	.269	.203	.242
275	.286	.201	.206
280	.301	.210	.182
285	.264	.195	.176
290	.237	.183	.172
295	.131	.124	.158
300	.067	.080	.139

P: pirogalol

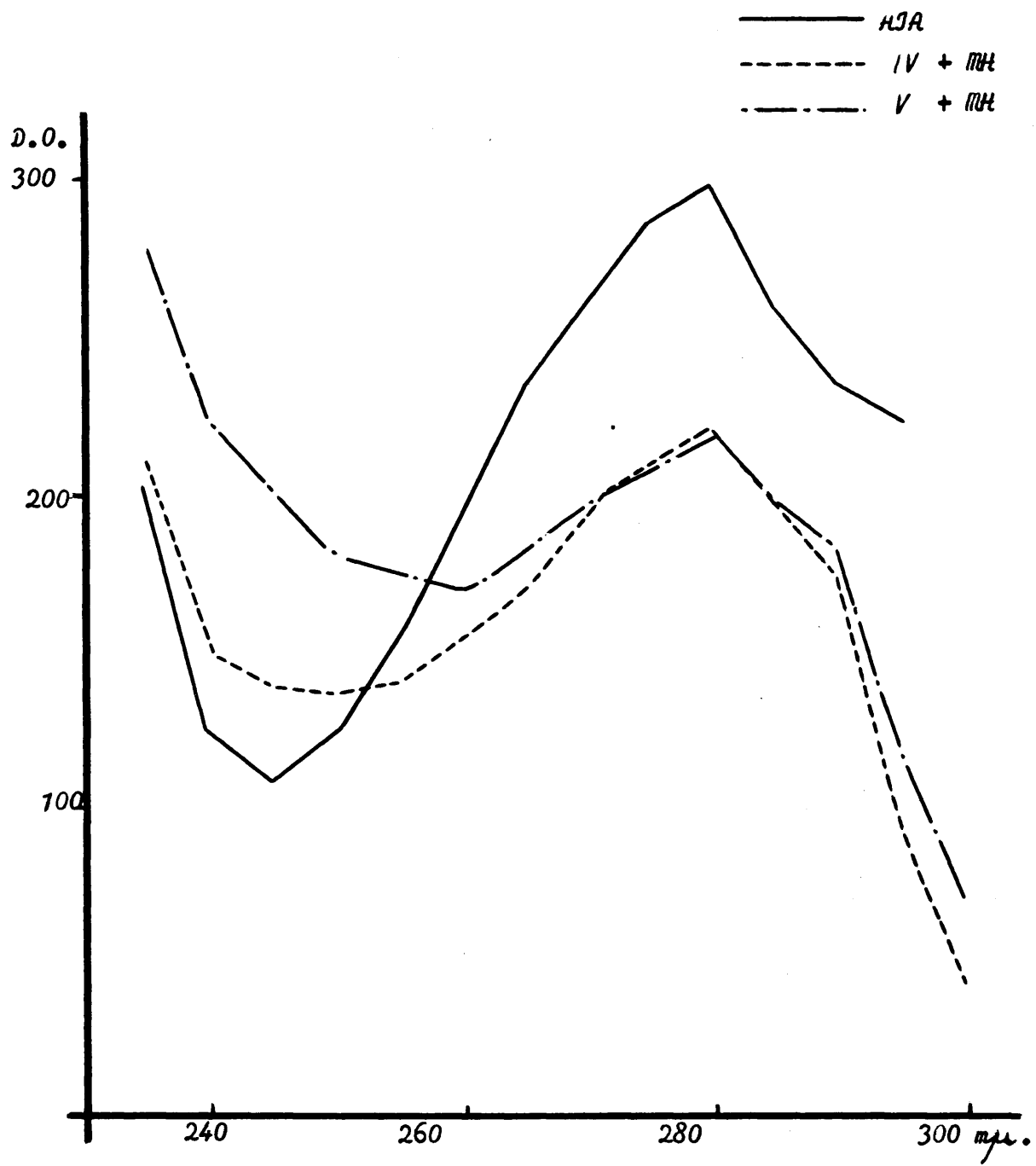
pBQ: p-benzoquinona





λ $\mu\mu$	AIA	IV+MH	V+MH	λ $\mu\mu$	AIA	IV+MH	V+MH
235	.196	.212	.278	270	.269	.194	.197
240	.114	.150	.223	275	.286	.208	.205
245	.108	.139	.200	280	.301	.219	.218
250	.118	.137	.181	285	.264	.194	.196
255	.154	.140	.174	290	.237	.174	.183
260	.190	.153	.169	295	.131	.090	.112
265	.233	.169	.180	300	.067	.140	.068

MH: maleicohidrazida



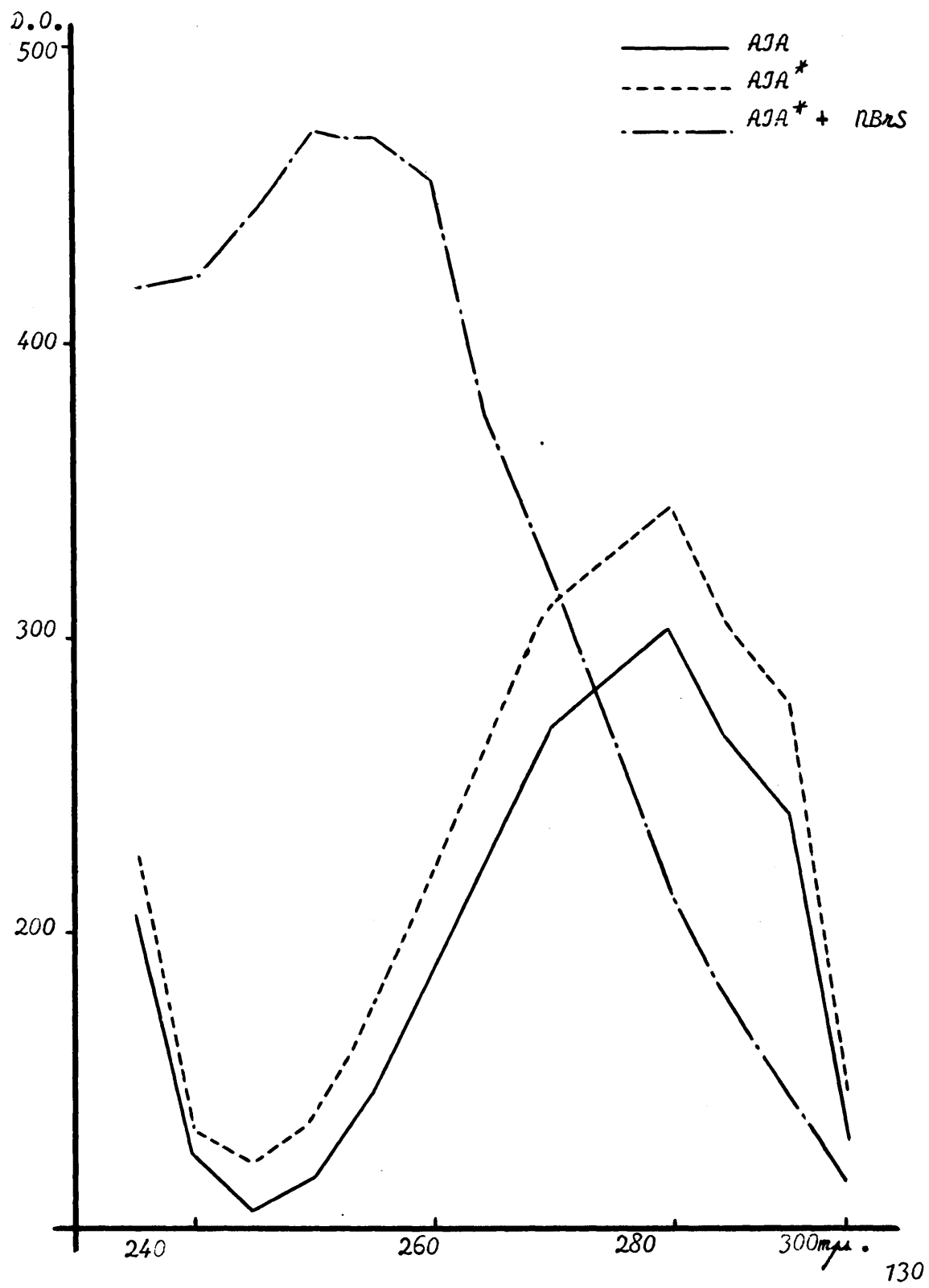
Dstrucción del AJA por acción conjunta de luz u.v. y NBrS

a) El espectro de la Fitohormona no sufre alteración despues de ser irradiado con luz u.v. durante 30 minutos. Agregandole 0,5 ml. de NBrS $5 \cdot 10^{-3}$ M el espectro u.v. se altera.

λ	AJA	AJA*	AJA*+NBrS
235	.207	.229	.420
240	.118	.194	.422
245	.107	.123	.445
250	.117	.138	.472
255	.145	.175	.470
260	.189	.222	.457
265	.232	.271	.372
270	.270	.312	.322
275	.288	.330	.268
280	.304	.346	.215
285	.266	.305	.175
290	.242	.280	.146
295	.123	.149	.116
300	.058	.074	.097

AJA*: AJA activado

AJA* NBrS: el anterior más NBrS



b) Destrucción del AJA con luz u.v. y HBrS en presencia de pirogalol.

El esquema utilizado es el siguiente:

1,75 ml. tampón fosfato 22 mM pH=5,6

0,5 ml. pirogalol $2,8 \cdot 10^{-3}$ M

0,75 ml. AJA $1,12 \cdot 10^{-3}$ M

El espectro u.v. del AJA de esta muestra, obtenido por el método diferencial, no presenta alteración ninguna. Tampoco parece afectado después de ser sometido a una irradiación de 30 minutos con luz u.v.

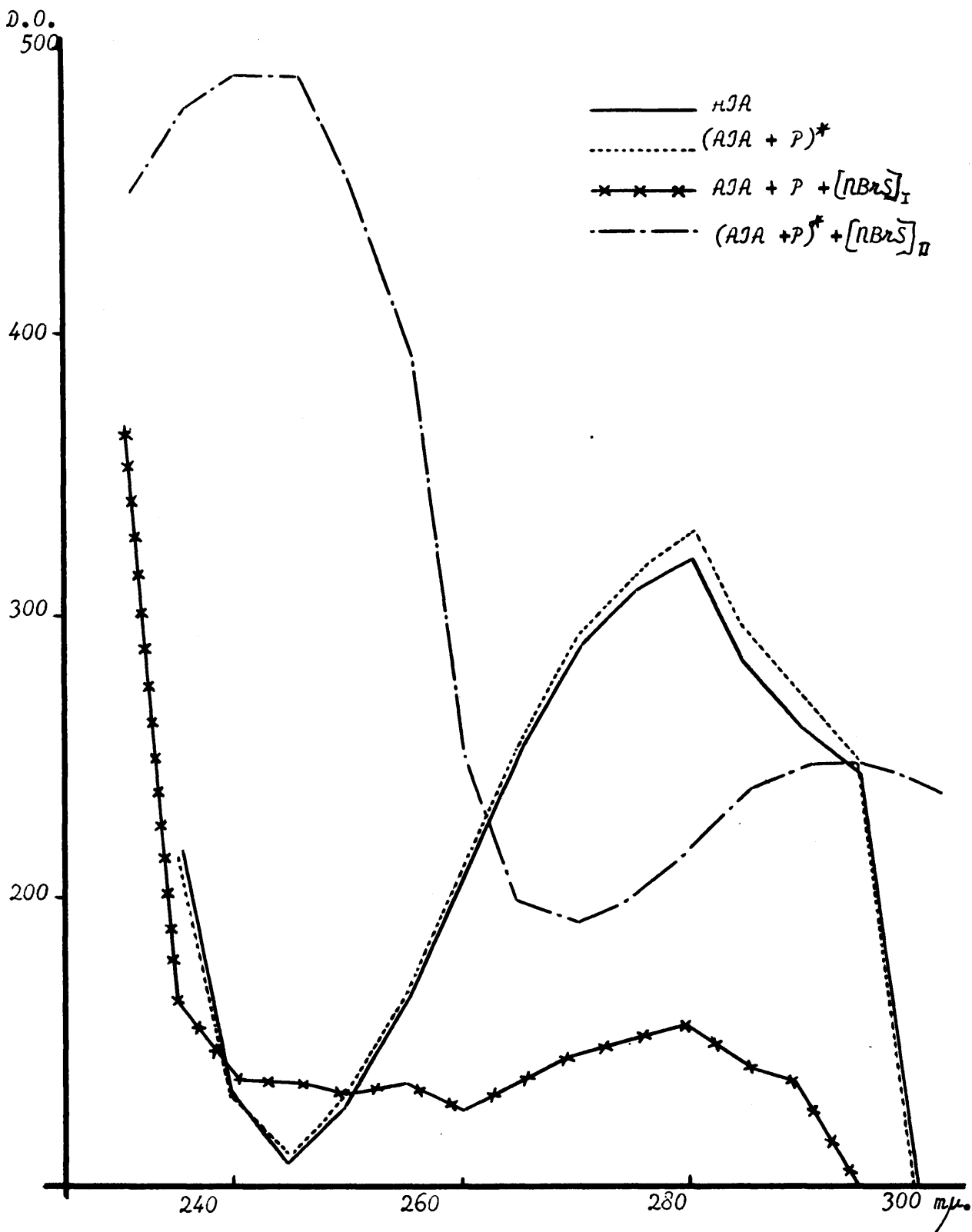
Si a una muestra similar a la inicial anterior se le agregan 0,5 ml. de HBrS $5 \cdot 10^{-3}$ M el máximo a 280 m μ . aparece disminuido. Si la muestra ha sido previamente irradiada durante 30 minutos el espectro sufre transformación.

$$[\text{HBrS}]_I : 1,42 \cdot 10^{-4} \text{ M.}$$

$$[\text{HBrS}]_{II} : 4,54 \cdot 10^{-4} \text{ M.}$$

$\lambda_{m\mu}$	$A/A + P$	$(A/A + P)^*$	$(A/A + P)(NBrS)_I$	$(A/A + P)^*(NBrS)_I$
230	.710	.715	.370	.459
235	.218	.215	.163	.479
240	.130	.129	.136	.492
245	.116	.118	.136	.492
250	.130	.134	.132	.450
255	.163	.166	.135	.395
260	.206	.208	.126	.255
265	.253	.255	.136	.199
270	.290	.295	.146	.193
275	.310	.316	.150	.200
280	.324	.332	.156	.217
285	.285	.294	.142	.238
290	.262	.271	.135	.248
295	.146	.150	.034	.250
300	.079	.078	.050	.243

$(A/A + P)^*$: indica que la mezcla ha sido irradiada.



Efectos del pH_F y Del A.C. Giberelico sobre la fitohormona medidos

Colorimetricamente con Reactivo Salkowsky

El esquema seguido para los ensayos:

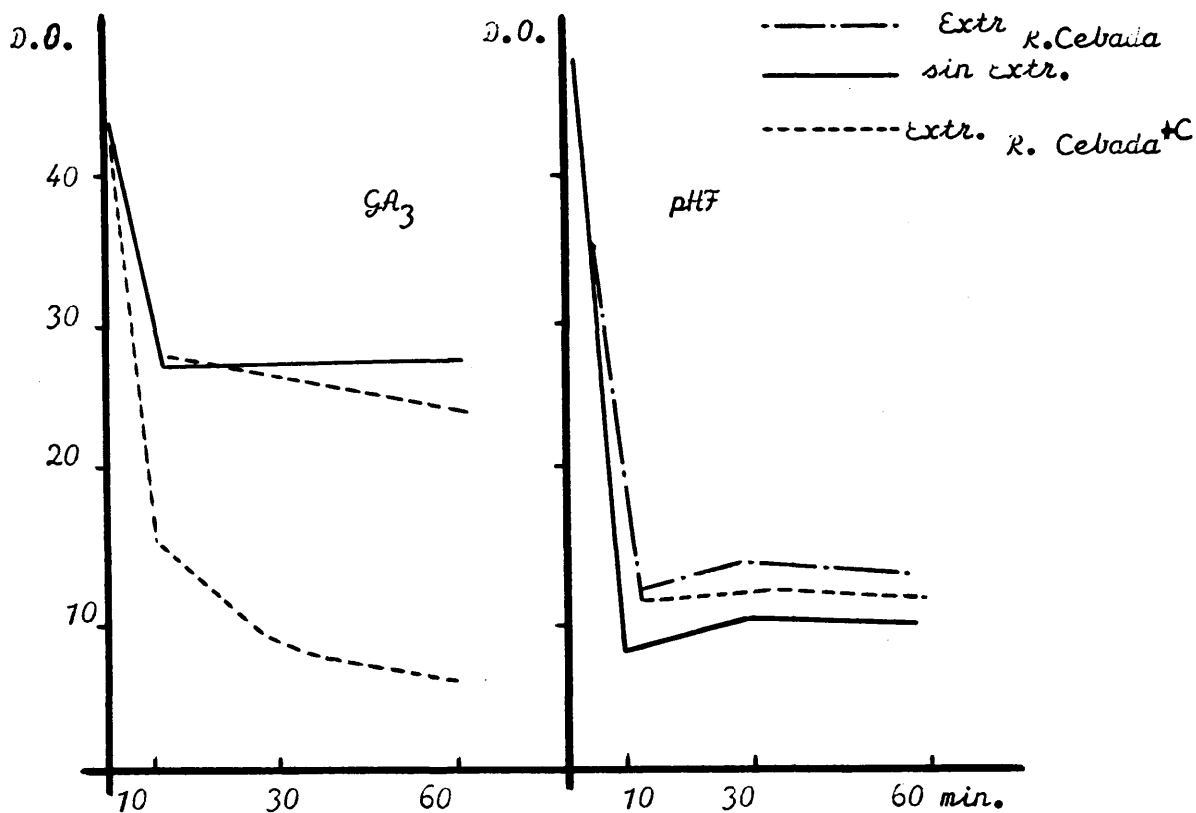
Extracto natural ó tratado 1 ml.

pH_F ó ac. giberelico $5 \cdot 10^{-3} M$ 1 ml.

AJA 200 γ/ml. 1,5 ml.

Los ensayos con extractos tratados llevan adicionado 0,5 ml. de activador exógeno ($Mn^{2+} 5 \cdot 10^{-3} M$)

Con ambos tipos de extracto y también en ausencia de este se agrega tampón fosfato 22 ml pH=5,6 hasta completar los 6 ml. de volumen final.

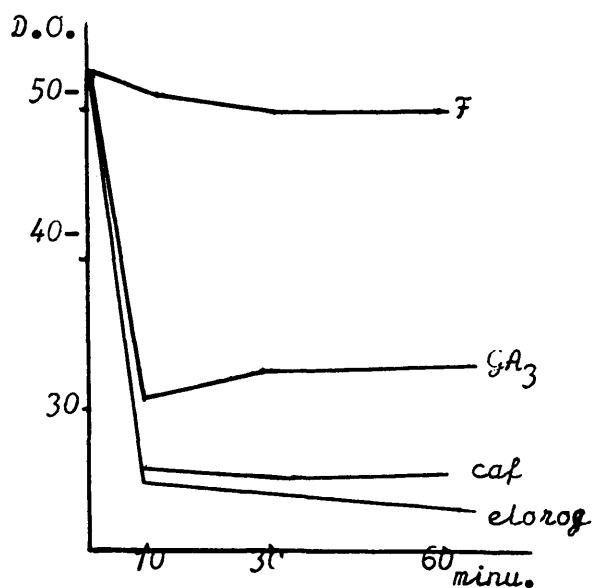


Efectos de la interacción de pH₂F y ac. giberelico sobre la fitohormona en presencia de extractos naturales, tanto os y en ausencia de ellos. La concentración de pH₂C es $5 \cdot 10^{-4}$ M y la de los otros dos reguladores $5 \cdot 10^{-3}$ M.

[illegible]

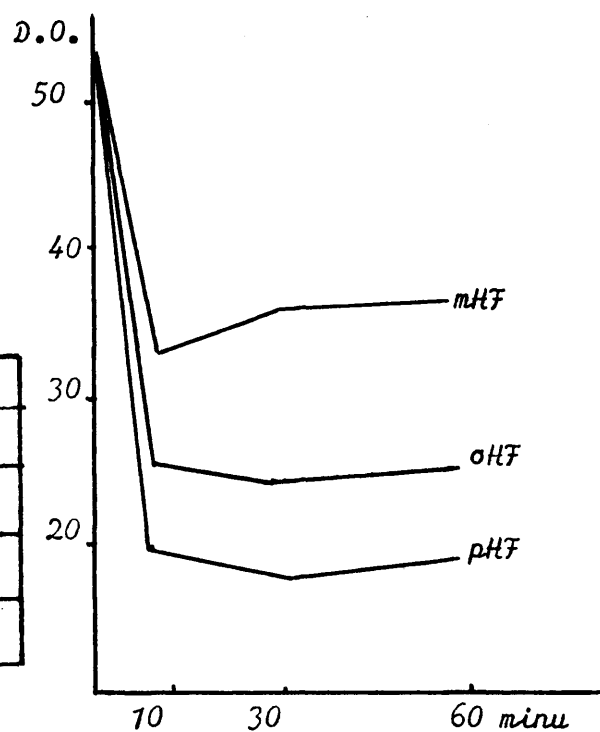
Interacción en ausencia de extracto - efecto directo -.

Efectos de las distintas estructuras químicas y diversa posición del mismo grupo funcional



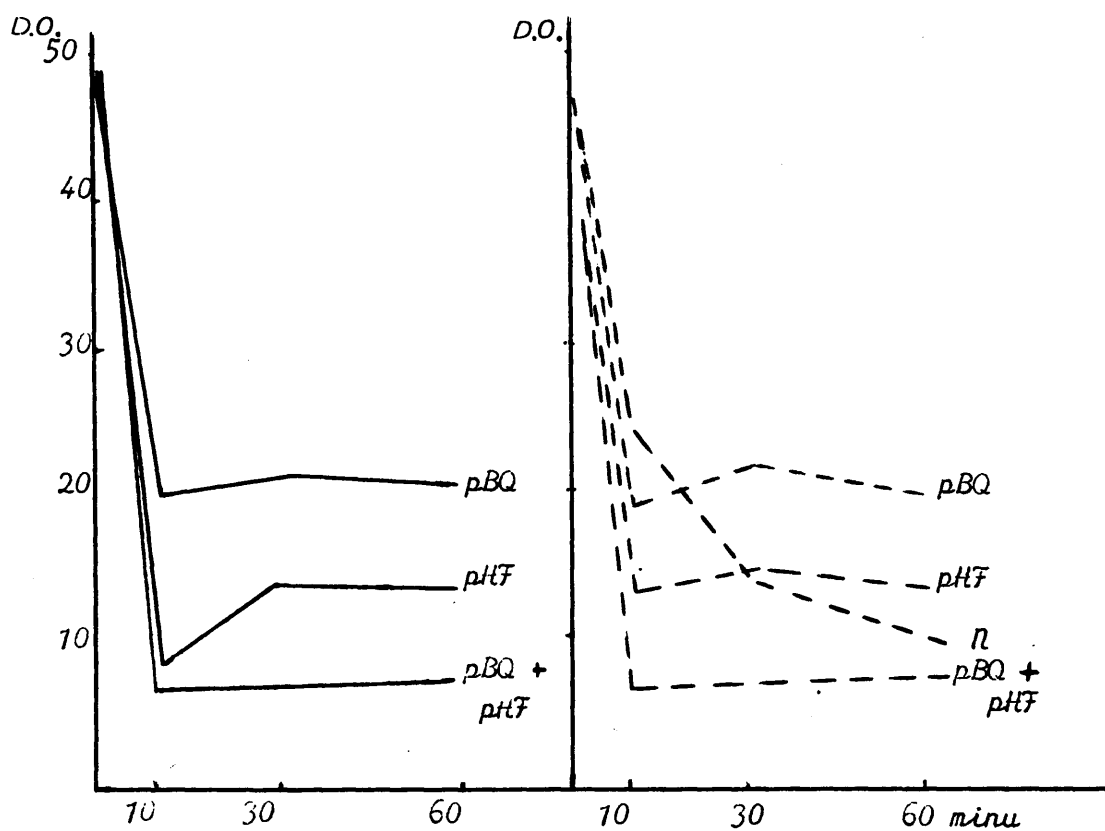
D.O. x 100			
$\begin{matrix} \text{min} \\ 5 \cdot 10^{-3} \end{matrix}$	10	30	60
F	51 ₅	50	50
Caf	26	25	25
Clorg	25	24	23
GA ₃	31	32 ₅	33

D.O. x 100			
$\begin{matrix} \text{min} \\ 5 \cdot 10^{-3} \end{matrix}$	10	30	60
oHF	25	24	24 ₅
mHF	32 ₅	35 ₅	36
pHF	19	17 ₅	18



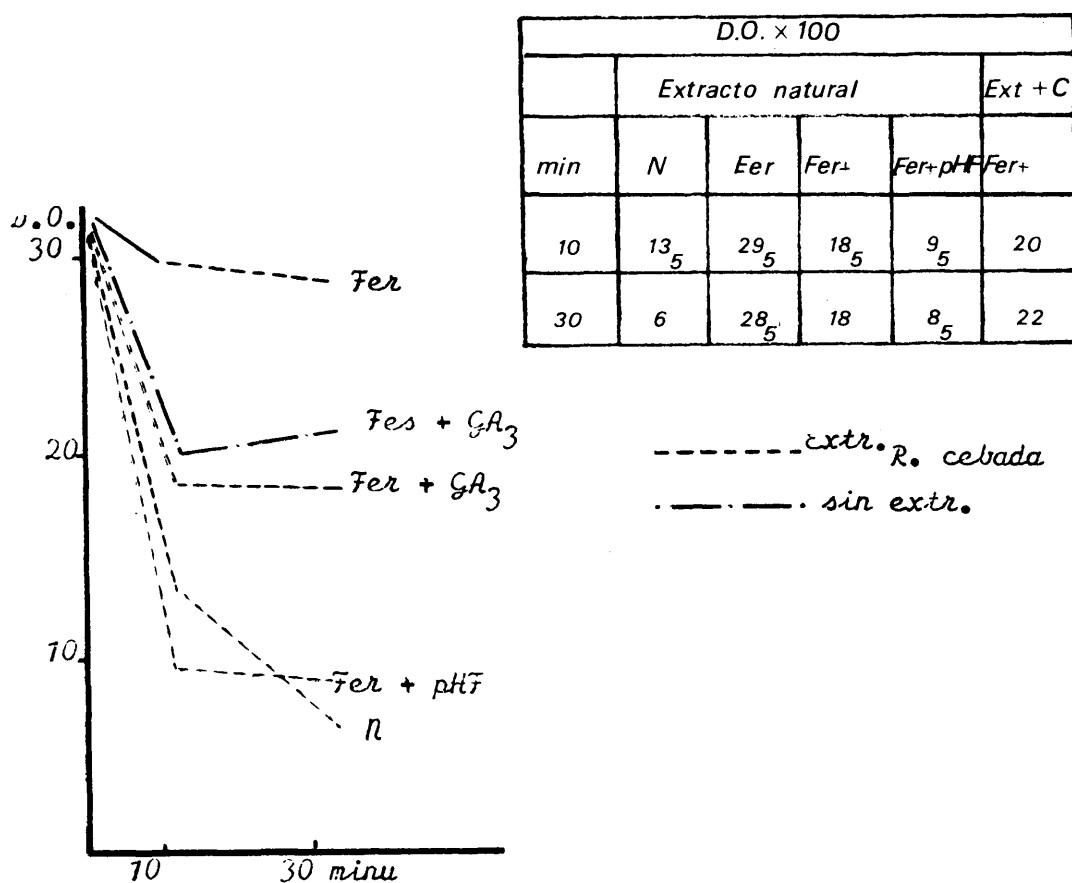
Efectos de la p-benzoquinona y el p-hidroxifenol en acción directa sobre la tiorhormona con y sin la presencia del extracto enzimático

	Cebada natural			Sin extr. enzimático		
minutos	10	30	60	10	30	60
Natural	24 ₅	14	10			
pBQ 5.10 ⁻³ M	19	22	20	20	21	20 ₅
pHF 5.10 ⁻³ M	13	14 ₅	13 ₅	8 ₅	14	13 ₅
pBQ+pHF	6 ₅	7 ₅	7 ₅	7	7 ₅	7 ₅



La acción de ambos compuestos es activa y completamente independiente de la del extracto enzimático, según puede apreciarse en los gráficos.

Al estudiar el efecto que un inhibidor fuerte produciría sobre este tipo de reacciones, se observó que el ac. ferúlico $5 \cdot 10^{-3}$ M no provoca efecto alguno sobre el GA_3 ni sobre el pH, ya que los resultados son similares a los causados por estos compuestos sobre los extractos tratados.



Efectos directos producidos por diversos compuestos fenólicos.

% AIA desaparecido							
minutos	10	30	60		10	30	60
F $5 \cdot 10^{-3}$ M	2	5	5	gentisico	20,5	18,5	20,5
oHF	54	55,5	54,5	pHC $5 \cdot 10^{-4}$	3	5,5	5,5
mHF	40	34,5	33,5	pHC	25,5	23,5	26,5
pHF	65	67,5	66,5	cafeico	47	48,5	50,5
pBQ	59	57	58	clorogénico	48	50	51
pHB	0	0	0				

Acción directa del ac. ascorbico a diversas concentraciones.

% A / A no revelado			
min	10	30	60
ascorbico $3 \cdot 10^{-2} M$	78	76'5	76'5
ascorbico $5 \cdot 10^{-3} M$	3	4	5
ascorbico $5 \cdot 10^{-4} M$	0	2	2
ascorbico $5 \cdot 10^{-5} M$	0	0	2

Como confirmación de todo esto, se intentó su estudio por medios espectrofotometricos puesto que pudiera traducirse en una alteración de los espectros de absorción del ácido. Para ello se realizaron los ensayos en diversas circunstancias no observandose desplazamiento en el espectro de la Fitohormona.

Insistiendo en los resultados obtenidos mediante la reacción de coloración, primeramente se comprobó la formación de compuestos coloreados en el reactivo Salkowsky de las diversas sustancias, que pudieran dar lugar a interferencias, pero los resultados fueron negativos en todos los casos.

Se intentó la aclaración de estos efectos por medio del metodo siguiente:

Se prepararon las soluciones base según:

	I	II	III
tampón pH= 5,6	3,5 ml.	2 ml.	6 ml.
comp. fenólico $5 \cdot 10^{-3}$	1 "	-	2 "
AJA 200 γ /ml.	1,5 "	2 "	-

Las medidas se realizaron a 535 m μ . con muestras obtenidas llevando las mezclas sobre 8 ml. de reactivo Salkowsky más 1 ml. de alcohol etílico. Como tiempo cero se tomo el momento de agregar a un tubo 1 ml. de I y al resto 0,5 ml. de III. Despues, en estos últimos, a distintos tiempos se agregó 0,5 ml. de II y se midieron doce minutos después de agitar.

$5 \cdot 10^{-3} M$ \ min	0	10	30
F		51	50
oHF		25	24
mHF	39	41	35
pHF	14	17 ₅	19 ₅
PBQ	23	25	24 ₅
Piragalol		5	4 ₅

Como puede verse la caída de color aparece siempre en los compuestos capaces de formar semiquinonas.

Interaccion GA₃/AIA

La accion que el ac. giberelico pudiese tener sobre el AIA se estudio con detenimiento dada la importancia que estas sustancias tienen dentro del campo de la fisiologia vegetal.

Los resultados son similares en presencia o ausencia de extracto enzimático.

a) En presencia de extracto

Esquema experimental:

Extr. de raiz (2grs/10 ml.) natural o tratado con C 1 ml.

GA₃ a distinta concentracion molar 1 ml.

AIA 200 γ/ml. 1,5 ml.

Tampón fosfato 22 mM pH= 5,6 hasta completar 6 ml. de volumen total

% AIA desaparecido						
	Extracto R. Cebada			Extracto R. Avena		
	10	30	60	10	30	60
min						
GA ₃ 5·10 ⁻³ M	68,5	77	72	43	43,5	41,5

AIA desaparecido en %						
	Extr. + C R. cebada			Extr. + C R. avena		
Tiempo (min.)	10	30	60	10	30	60
GA ₃ 5·10 ⁻³ M	38	38	43	43,5	41	43,5
GA ₃ 5·10 ⁻⁴ M	5	7	9,5			
GA ₃ 5·10 ⁻⁵ M	2,5	2,5	7			

b) En ausencia de extracto

Esquema experimental:

GA₃ a distinta concentración molar 1 ml.

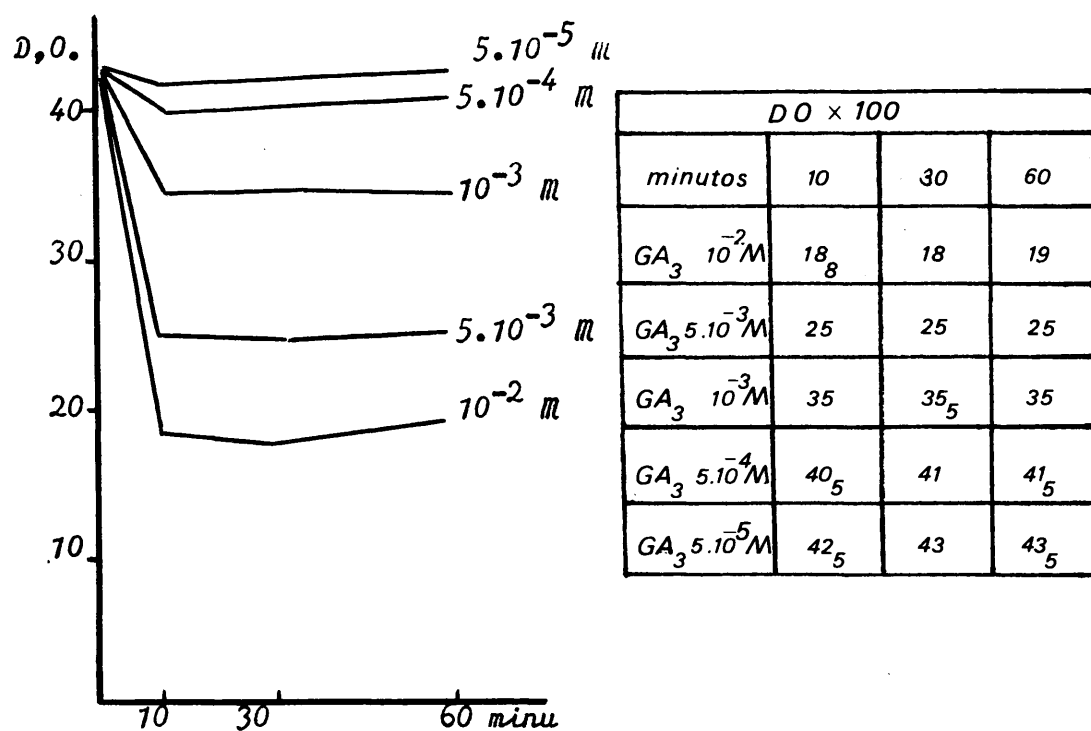
AIA 200 γ/ ml. 1,5 ml.

Tampón fosfato 22 mM pH= 5,6 en cantidad suficiente para completar 6 ml. de volumen total

Se presentan los resultados para distintas concentraciones de ac. giberélico, siempre frente a la misma concentración de AIA.

AIA desaparecido en %							
Tiempo (min)	10	30	60	Tiempo (min)	10	30	60
GA ₃ 10 ⁻² M	57	58,5	56,5	GA ₃ 5·10 ⁻⁴ M	6	6	5
GA ₃ 5·10 ⁻³ M	41,5	39	42	GA ₃ 5·10 ⁻⁵ M	2,5	0,5	0
GA ₃ 10 ⁻³ M	9,5	12	9,5				

En el grafico puede apreciarse claramente que el efecto producido es proporcional a la concentración



Cuando se varia la concentración de AIA frente a una constante de ac. guberélico se obtienen los resultados siguientes, expresados en γ y en %, de AIA desaparecido

AIA γ /ml	100	50	25
γ AIA desap	28,5	20	15,5
% AIA desap	28,5	40,5	62,5

El GA₃ es 5.10⁻³ M

Efectos de pH, polaridad y fuerza iónica

Los ensayos realizados con tampón fosfato 22mM para un intervalo de pH de 4,7 a 7,8 así como las de fuerza iónica verificadas con este mismo tampón con soluciones 0,1 0,01 y 1 M permitieron apreciar una total coincidencia de resultados para todos los casos.

Las pruebas de polaridad del medio realizadas con tampón, alcohol etílico y mezcla de ambos al 75, 50 y 25% dieron resultados irregulares.

Acción reductora

Los agentes reductores (ac. ascorbico, cisteína, polifenoles) interfieren mas o menos en la intensidad y en la duración del desarrollo del color del HJA en presencia del reactivo Salkowski.

Esquema experimental:

Soluciones base

	I	II	III
Tampón pH=5,6	3,5 ml.	2 ml.	6 ml.
comp. reductor	1 ml.	-	2 ml.
HJA 200 γ/ml.	1,5 ml.	-	-

a) Acido ascorbico

$D.O. \times 100$				
Tiempo (min)	0	10	30	60
$5 \cdot 10^{-2} M$	12	11 ₈	11 ₃	11 ₈
$5 \cdot 10^{-3} M$	46 ₈	48 ₈	50	49

b) Acido giberélico

$D.O. \times 100$ *					
Tiempo (min)	0	2,5	5	10	15
$2,5 \cdot 10^{-2} M$	17	15 ₈	20 ₈	38	41

Las medidas se realizaron a 535 m μ . con muestras obtenidas llevando las mezclas sobre 8 ml. de reactivo salkowski mas de 1 ml. de alcohol etilico. Como tiempo cero se tomó el momento de agregar a un tubo 1 ml. de I y al resto 0,5 ml. de III. Después, en estos últimos, adistintos tiempos se agregó 0,5 ml. de II y se midieron 12 minutos después de agitar.*Una nueva lectura de estas medidas realizadas 20 minutos despues dió como resultados los mismos valores obtenidos en la primera.

Complejo QUINONA/AJA

Efectos de pH, polaridad y fuerza iónica

La variación de la polaridad dentro de mezclas alcohol-agua presenta los mismos resultados en todas las pruebas.

La molaridad se probó para el tampón fosfato en soluciones 1, 0.1 0.01 M apreciándose una similitud en los resultados.

Tanto la polaridad, como la molaridad y el pH se estudiaron con ~~p~~hidroxifenol $5 \cdot 10^{-3}$ M por ser el difenol que presenta los efectos mas claros.

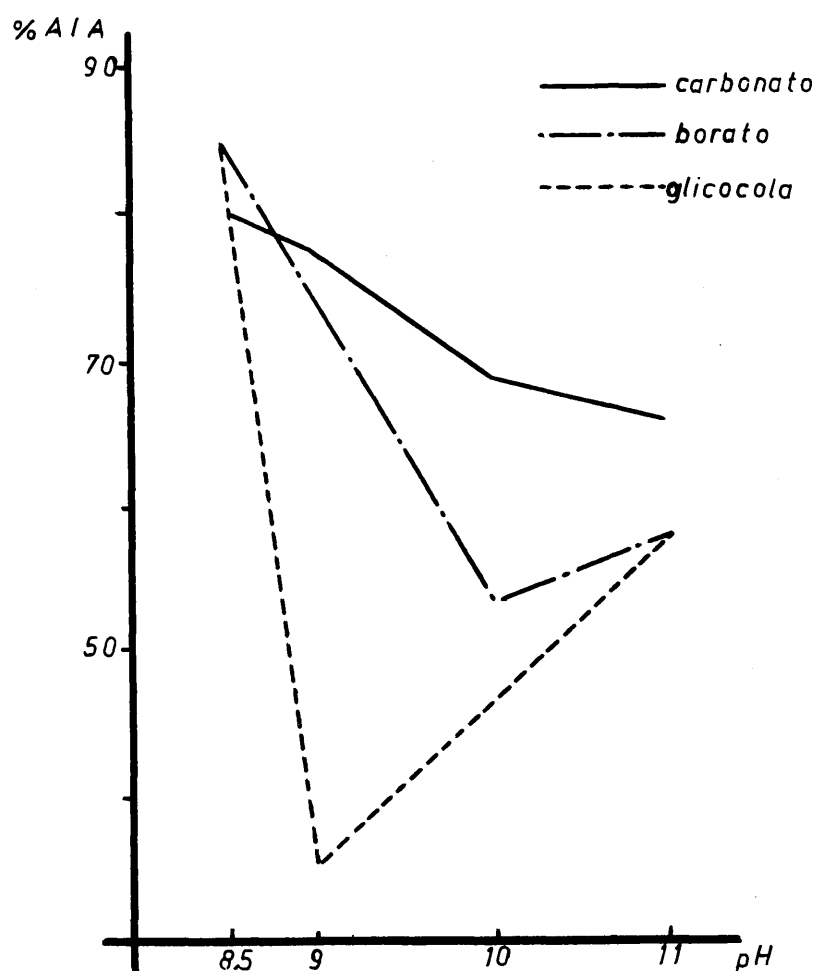
Se buscó el efecto del pH independientemente del tipo de tampón que se utilizase y se observó que la caída de color (siempre según el reactivo Salkowski) disminuía entre pH 8 y 9, pero que la naturaleza del tampón también influía.

D.O. $\times 100$												
tampón	carbonato				borato				glicocola			
pH	8,7	9	10	11	8,5	9	10	11	8,5	9	10	11
control AIA	39,5	38,5	40,6	39,1	35,6	34,5	29,1	30,5	38,4	38,5	37	39,5
AIA desap.	31,6	29,9	27,9	25,6	33,5	26,3	15,6	17,5	32,9	13,8	17,5	22,6

en la tabla se comparan los resultados logrados con tres tipos de tampones para cuatro valores de pH y una molaridad de 0,1 . Se eligieron: carbonato, por ser inerte, puesto que no se capaz de formar ningún

tipo de complejo; borato y glicocola capaces de formarlo. Como valores de pH se eligieron 8, 9, 10 y 11 por ser comunes para los tres tampones y corresponder a la zona critica observada.

En el grafico se presentan los resultados en % de HIA desaparecido.



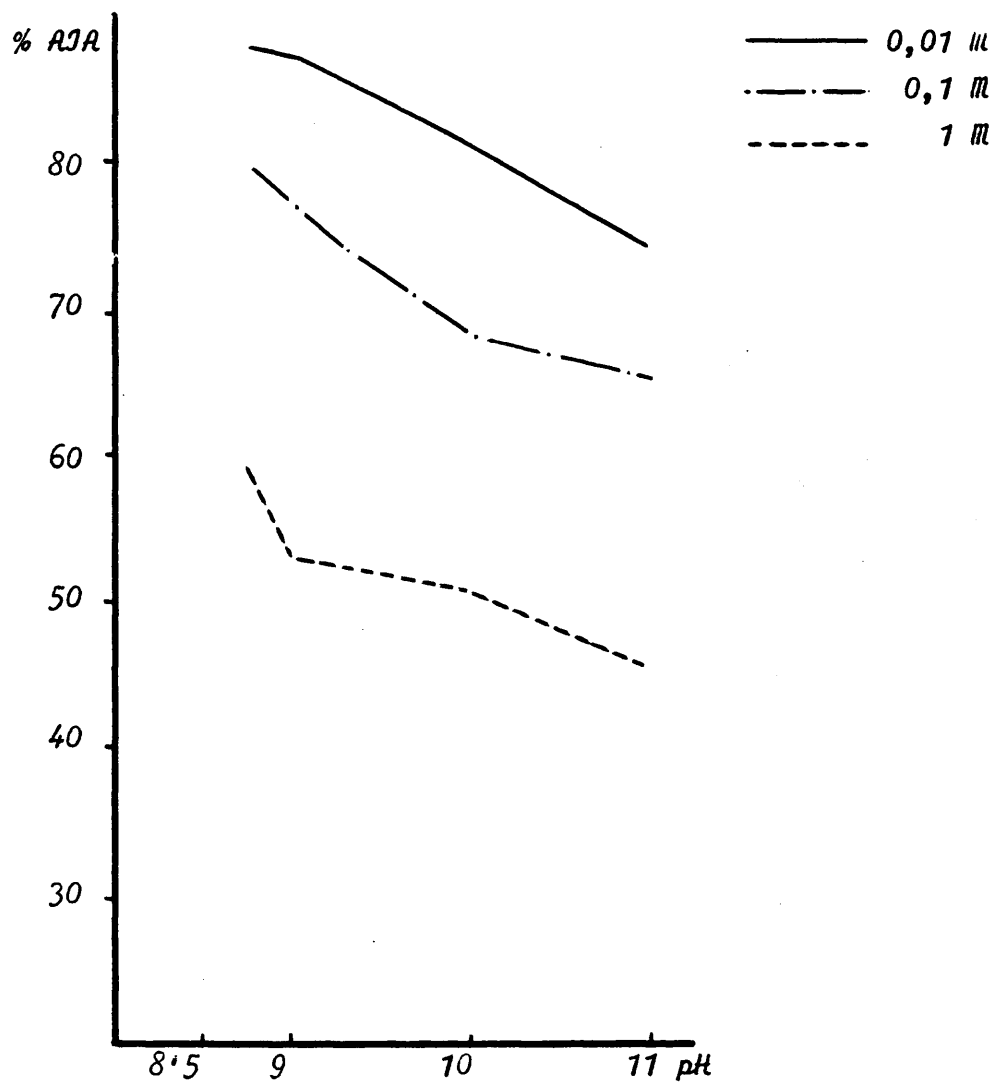
Las muestras en tampón carbonato se colorearon de marrón-amarillento más intenso para mayor pH, debido a la oxidación del p-hidroxifenol en medio básico. Las muestras conteniendo tampón borato, resultan mas fuertemente coloreadas y para pH=10 la cantidad de HIA desaparecido es muy baja aumentando luego para pH mas alto. Las soluciones en tampón glicocola eran fuertemente coloreadas de rojo, que se hacia mas oscuro conforme aumentaba el pH. El minimo de auxina enrascarada corresponde a pH=9

Aunque en el tampón fosfato la variación de la molaridad del medio no presentaba diferencia de resultados, se hizo un nuevo estudio con los tampones anteriores y a continuación se presentan los resultados en % de HIA desaparecido y en el grafico lo relativo al carbonato

Borato				
pH	8,5	9	10	11
0,01M	87,5	84	60	60
0,1 M	85,5	76	53	57,5
1 M	71,5	67	33,5	25

Glicocola				
pH	8,5	9	10	11
0,01M	87	75	46,5	49
0,1 M	85,5	36	47	57
1 M	75,5	63,5	20	19

Carbonato				
pH	8,7	9	10	11
0,01 M	88	87,5	81,5	74,5
0,1 M	80	77,5	68,5	65,5
1 M	59,5	53	51	46



Se estudió la interacción de la auxina con los 1-2, 1-3 y 1-4 hidroxifenoles por métodos espectroscópicos diferenciales sin obtener resultados claramente apreciables, tanto para los espectro en el visible como en el u. V.

También se intentó comprobar si había verdadera destrucción de la auxina en presencia del p-hidroxifenol por medio de la reacción de coloración de Erlich según el esquema siguiente:

10 ml. de problema

1 ml. de sol. al 5% de alc. etílico de 4-dimetoxiaminobenzaldehído

1 ml. de ac. clorhídrico conc.

El AJA da con este reactivo una coloración morada muy débil mientras que el metil-Indol, un posible producto de degradación, da una coloración morada fuerte. Las medidas se realizaron en un colorímetro de prisma, con filtro rojo y con filtro verde y en ambos casos se obtuvieron absorbancias mayores para las muestras que para los controles

Competición

Intentamos observar una posible competición con la auxina en la formación del complejo AIA/Quinona por medio de compuestos afines y derivados de la Fitohormona, que pudiera interaccionar competitivamente con los difenoles, siguiendo para ello el esquema:

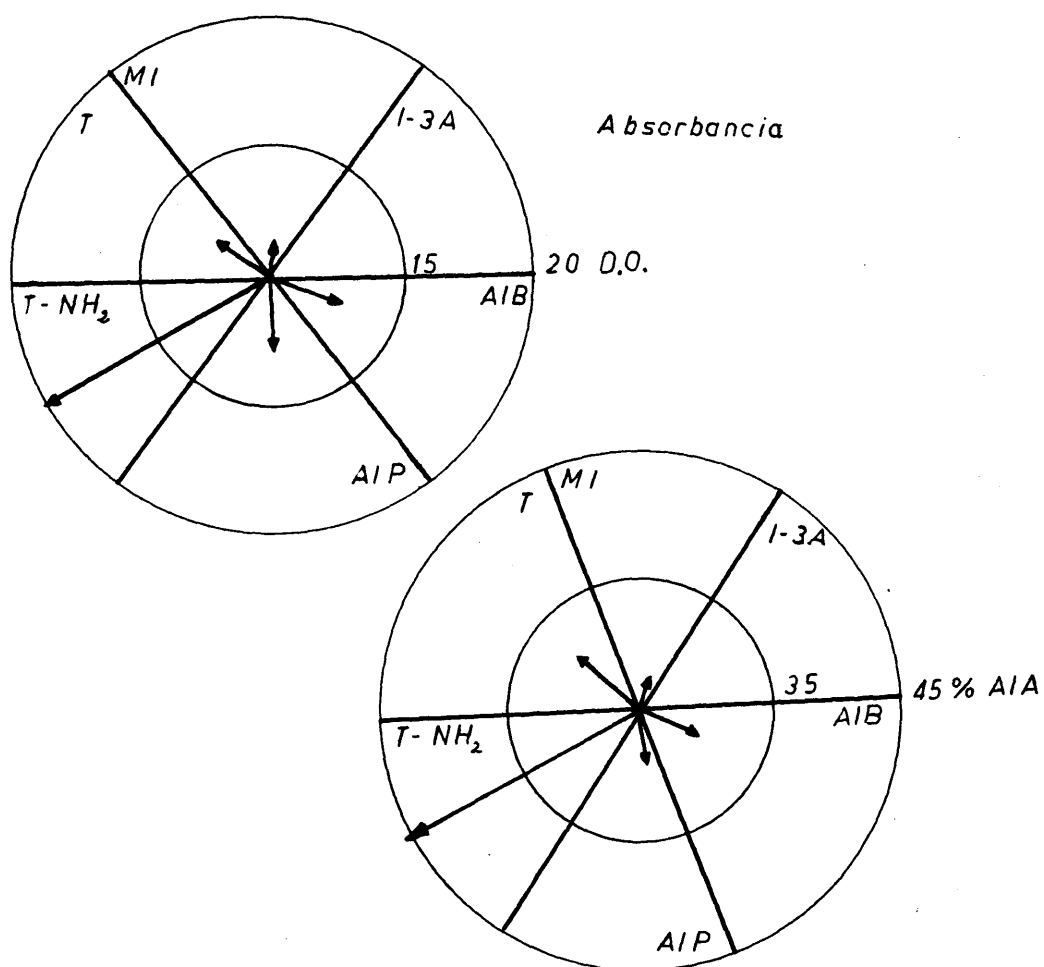
tampón-pH _{5,6}	2 ml	3,5 ml	3,5 ml	3 ml
p-F $5 \cdot 10^{-3} M$	1	1	1	-
X $2,8 \cdot 10^{-3} M$	1,5	1,5	-	-
AIA 200 γ/ml	1,5	-	1,5	1

El método de medida es el colorimétrico con el reactivo Salkowski. Los resultados se expresan en las tablas en absorbancias a 535 m μ . corregidas con los blancos y en %, de AIA libre, es decir teóricamente el que no está enmascarado por ninguna de las sustancias probadas. El control de Fitohormona libre en presencia de pH_{5,6} tiene una D. O. corregida de 10 que corresponde por calibrado a un 25% de auxina.

X	Absorbancia	% AIA libre	X	Absorbancia	% AIA libre
AIA	10	25	Triptamina	19 ₂	46
Indol	1 ₆	5,5	Indol-3 prop	12 ₅	29,5
Metil-3I	11 ₄	25,5	Indol-3 but	12 ₃	30,2
Triptofano	12 ₆	32,5	Indol-3 aldeh	9 ₈	24,5

En los graficos se presentan los valores obtenidos, por diferencia con los de control, para ambas formas de expresión.

Los casos del Indol y del Indol-3-aldehido presentan valores inferiores a los controles, aunque por distinta causa. El primero dá coloración con el Salkowski en presencia del pH7 mientras que el aldehido en el mismo caso no colorea el reactivo



Complejo pirogalol/auxina

El esquema seguido fue:

1 ml. de extracto enzimático (2gr. raíces/10 ml.) & Peroxidasa

(Horseradish Sigma 100 γ /ml.)

1,5 ml. H₂A (200 γ /ml.)

1 ml. Pirogalol $5 \cdot 10^{-3}$ M

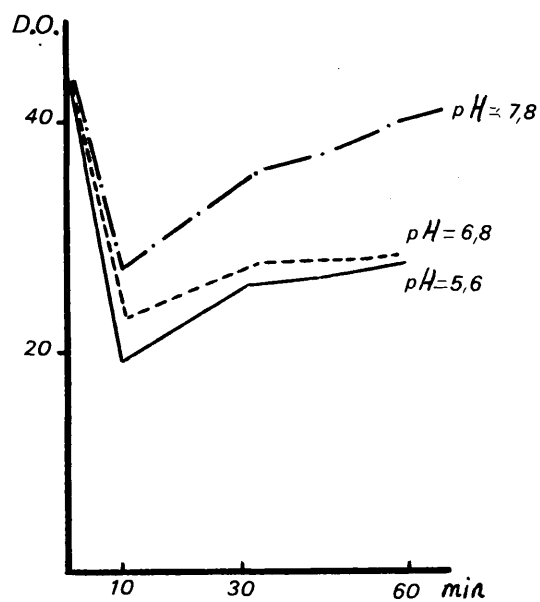
Solución tamponada de fosfatos 22mM hasta 6 ml. a distintos pHs.

Extracto nuevo R.Cebada					
sin Pirogalol			con Pirogalol		
pH = 5,6	pH = 6,8	pH = 7,8	pH = 5,6	pH = 6,8	pH = 7,8
18	36 _s	44	2	4	6
9	26	43 _s	2 _s	4	6
7 _s	13 _s	40 _s	3 _s	5	10 ₃
Extracto viejo R.Cebada *					
sin Pirogalol			con Pirogalol		
pH = 5,6	pH = 6,8	pH = 7,8	pH = 5,6	pH = 6,8	pH = 7,8
22	43	44	18	23	27
11	43	42	25	27	35
9	40	41	27	28	40

* Extr. viejo obtenido de raíces utilizadas 6 días después de cortadas.

$pH=7,8$ Peroxidasa 100 μ /ml		
minutos	sin Pirg	con Pirg
10	43	8
30	39	9
60	33	12
120	25	19
180	21	26

En el grafico extr. viejo
R. cebada + P.



DISCUSSION & CONCLUSIONS

Discusión.

El ácido Indol-3-acético es la Fitohormona principal de las plantas y junto con otros cofactores regula su crecimiento.

En la germinación visible de la cebada se aprecia con claridad la desigual tolerancia de este ácido por los distintos órganos de la misma plántula. La raíz tolera concentraciones exógenas inferiores a 10^{-5} M, mientras que el tallo tiene un mayor margen de tolerancia, hasta 10^{-4} M.

Los mecanismos reguladores de estas exigencias fisiológicas son la síntesis y la degradación de la Fitohormona, sin olvidar posibles translocaciones y conjugaciones. En este trabajo se estudia solamente el catabolismo auxínico en las raíces de los cereales.

Entre los cereales de interés agrícola y maltero resaltamos en esta publicación las diferencias observadas entre la cebada cervecera y la avena común, elegidas por su distinto comportamiento germinativo frente a un exceso de agua, es decir la avena presenta una mayor sensibilidad al agua que la cebada.

Los efectos de algunos compuestos fenólicos sobre la germinación visible de estos cereales nos reveló su participación en el Catabolismo Auxínico.

El ácido Ferúlico y la Vanillina presentan acciones inhibitoras en la germinación visible más fuertes que el ácido Vanillínico y más acentuadas en la avena que en la cebada.

En relación con la germinación visible observada, se inició el es

tudio del mecanismo de degradación de la Fitohormona con extractos de raíces. Los extractos crudos de raíces frescas de estos cereales tienen el sistema enzimático AIA-oxidasa responsable de la degradación oxidativa de la auxina, pero con distintas actividades, ya que mientras los de cebada muestran actividad los de avena requieren la destrucción o eliminación de sustancias inhibitoras. Los ~~tratamientos~~ realizados con este fin desactivan el sistema enzimático por carencia de cofactores funcionales. La adición de extractos de raíz de cebada hervidos restaura la actividad y demuestra la existencia de cofactores termoes-
tables.

Los extractos enzimáticos crudos de raíces frescas de cebada concentrados, presentan un período de inducción que se elimina por dilución; una mayor dilución de la concentración del enzima frente a la misma concentración de sustrato (AIA) logicamente disminuye la actividad.

La destrucción de los cofactores e inhibidores mediante el tratamiento con agua oxigenada o su eliminación con carbón activo y recuperación por desadsorción nos muestra su naturaleza fenólica.

Los extractos crudos de las raíces de estos cereales con distintas concentraciones de compuestos fenólicos presentan apoenzimas con características similares.

El apoenzima, en presencia del ácido p-hidroxicinámico o el fenol, con iones Mn^{2+} como activador restaura completamente la actividad del sistema enzimático. Entre los activadores metálicos, los iones Mn^{2+} tienen un efecto muy superior a los iones Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} , pre-

sentando los iones Cu^{2+} un gran efecto inhibitorio.

Por coordinación con los medios de germinación utilizados en la acción de los compuestos fenólicos, se opera generalmente a pH 5,6, aún cuando el pH óptimo del sistema enzimático sea algo más ácido 3,5 - 5,6

Engelsman encuentra que los compuestos fenólicos utilizados como cofactores o inhibidores del sistema - ácidos p-hidroxicinámico y ferúlico - se destruyen en función de la desaparición del AIA. Quizá por ello, el pHC a concentración de $5/6 \cdot 10^{-5}$ M actuando como cofactor no reactiva el sistema. Sin embargo, a grandes concentraciones, $5/6 \cdot 10^{-3}$ M inhibe, probablemente por competición con el sustrato.

Los cofactores endógenos de los sistemas enzimáticos de los distintos cereales, por supuesto que no tienen que ser los mismos, aunque los apoenzimas correspondientes sean similares. Los cofactores exógenos probados - fenol, ácidos p-hidroxicinámico, vanillínico, oHC, mHF - presentan un grupo OH libre. Entre los difenoles el m-difenol muestra como cofactor, a concentraciones exógenas de $5 \cdot 10^{-4}$ M mayor actividad que sus isómeros o- y p-. También la MH (maleicohidrazida) a altas concentraciones $5 \cdot 10^{-3}$ M y siempre, como en los casos anteriores en presencia de Mn^{2+} ($5 \cdot 10^{-3}$ M) actúa como cofactor en su forma fenólica (pH=5,6).

Entre los efectores - compuestos que modifican la actividad enzimática, sin que sean componentes esenciales del complejo enzimático funcional - se pueden distinguir dos grandes grupos:

I) Efectores positivos, con alguna acción sinérgica a determinadas concentraciones (pHB, oHB, ácidos verátrico, vanillínico, oHC).

II) Efectores negativos. Entre los efectores negativos o inhibidores

de la reacción enzimática cabe separar varios tipos por su modo de ac
ción:

a) Inhibidores de radicales libres

Compuestos polifenólicos capaces de formación de quinonas, por ejemplo los ácidos clorogénico, cafeico, protocatequico y gentísico, con fuerte acción inhibidora.

b) Inhibidores netamente competitivos

Compuestos fenólicos con grupos funcionales similares a los co-
factores y poseedores de estructuras con probables impedimentos steri
cos, que pueden competir con el cofactor nativo e incluso con el sus-
trato. Por ejemplo: ácido ferúlico.

c) Inhibidores generales no competitivos

Calor, metales pesados, etc.

Todos los compuestos con acción inhibidora apreciable por compe
tición, tienen como mínimo un grupo hidroxilo libre sobre un anillo
aromático en posición orto ó para respecto a otro grupo, como habían
previsto Gortner y Kent, y por ello, cabía esperar que los ácidos ciná-
mico y benzoico fueran inertes. Igualmente, en la cumarina la formación
de lactona y en el ácido salicílico el efecto orto enmascaran el grupo
OH y por consiguiente no exhiben actividad.

Los compuestos muy reductores, como el bisulfito, disminuyen la reac
tividad al poder destruir los peróxidos. El sulfuro sódico muestra mayor
acción inhibidora, y el ac. ascórbico $5 \cdot 10^{-4}$ M, sobre la avena tratada
con carbón activo y regenerada con cofactores exógenos, presenta una ac
ción mucho más intensa que sobre el extracto de raíz de cebada natural.

nes eluidas. Sin embargo, frente a un efector como la escopoletina las actividades enzimáticas del extracto de raíz de cebada y del apoenzima purificado por cromatografía en Sephadex G-200 en presencia de activador Mn^{2+} presentan valores crecientes en función del tiempo, mientras que la peroxidasa actuando a pH 5,6 en presencia de Mn^{2+} tiene una acción rapidísima.

Al determinar los efectos de la concentración del ión Mn^{2+} sobre la peroxidasa se aprecia claramente que en presencia de ac. pH 5. $5 \cdot 10^{-4} M$ el efecto es rápido destruyéndose un 80% de la Fitohormona para concentraciones $5 \cdot 10^{-4} M$ del activador.

El apoenzima purificado en las mismas condiciones presenta un fuerte período de inducción.

El hecho de que concentraciones del orden de $5 \cdot 10^{-5} M$ de Mn^{2+} tengan una apreciable acción sobre la actividad del apoenzima regenerado con cofactor - pH 5. $5 \cdot 10^{-4} M$, parece sugerir que la participación de la catalasa no es considerable en las condiciones naturales; pero aunque pequeña en la naturaleza, no debe despreciarse en determinadas condiciones - efecto activador del Mn^{2+} a altas concentraciones en presencia de relativamente alta concentración de un monofenol - la acción aditiva de la catalasa.

Las diferencias en el comportamiento de los sistemas enzimáticos de las raíces de cebada y de avena tienen su confirmación en la diferente cantidad y naturaleza de los compuestos presentes en sus extractos. Estos compuestos se aislaron en varios grupos (ácidos, fenoles, lípidos) y se separaron cromatográficamente sobre capa fina en una

y dos dimensiones, apreciándose por su fluorescencia bajo la luz U.V. y por detección con distintos reveladores.

Entre los compuestos fluorescentes, el de mayor intensidad se encuentra en los extractos de avena, que después de múltiples separaciones en capa fina se aisló en forma pura y cuyos espectros U.V. e I.R. coinciden totalmente con los de la escopoletina.

Al mismo tiempo se separaron otros compuestos fluorescentes con R_f definidos y se determinaron sus espectros U.V. buscando información sobre la posible naturaleza de sus estructuras (benzoica, cumarinica o cinámica).

De los lípidos, más abundantes en los extractos de avena que en los de cebada se separaron, por cromatografía en columna de sílica gel la fracción esteroídica por elución con benceno/cloroformo. Por cristalización en metanol se obtienen unos cristales blancos en agujas de P.F. 136°C y $[\alpha] = -33^{\circ}$.

La obtención de sus derivados acétilados y benzoilados confirma la presencia de β -sitosterol, como principal componente esteroídico.

Los extractos de las raíces de cebada y de avena presentan actividades peroxidasicas del mismo orden, aunque tengan distinta evolución; pero sus actividades catalasicas son muy diferentes, siendo mucho mayor para los extractos de raíz de avena.

La reacción AIA-oxidasa parece tener un sistema enzimático con especificidad casi absoluta, ya que ninguno de los compuestos probados - Indol, Metil-indol, ac. Indol-3-propiónico, etc. - con estructuras relacionadas, muestran actividad. La Indol-3-acetamida puede ser la

forma potencial de la Fitohormona, regulada por algún sistema del tipo de la Asparraquinasa.

El apoenzima purificado cromatográficamente presenta una ligera actividad y en el espectro U.V. aparece ya un máximo a 255 m μ . En presencia de cofactores su actividad aumenta y se utiliza para determinar espectrofotométricamente la velocidad de la reacción por la disminución del máximo a 280 m μ .

Estudiando el mecanismo de la reacción enzimática Fox y col. (1965) observaron la necesidad absoluta del oxígeno, la presencia y formación de radicales libres y la aparición de los compuestos intermedios I y II formados por interacción entre la peroxidasa y la Fitohormona y eléctricamente idénticos a los propuestos por Theorell para los formados a partir de simples peróxidos.

En el estudio cinético del sistema AHA-oxidasa directamente en las raíces troceadas, observamos la destrucción de la Fitohormona en función del oxígeno consumido y calculamos su relación.

La raíz troceada es un material adecuado para determinaciones diferenciales, al poderse pesar iguales cantidades, y probablemente en este material disminuirán los problemas de permeabilidad.

En el estudio de la cinética de la reacción, del sistema enzimático purificado cromatográficamente, mediante técnicas espectrofotométricas diferenciales observamos, que la velocidad de reacción $v = \frac{\Delta c}{\Delta t}$ - expresada por la variación de la concentración de la Fitohormona en función del tiempo - para el intervalo de concentración $2,8 \cdot 10^{-3}$ M a $0,142 \cdot 10^{-3}$ M, aumenta con la concentración.

La interacción Quinona/Auxina se aprecia claramente en todos los compuestos capaces de formar quinonas, sin que el efecto reductor de estos difenoles a concentración de $5 \cdot 10^{-3}$ M interfiera en su observación colorimétrica mediante el reactivo Salkowsky. Estos difenoles, mantienen la misma capacidad de interacción con formación de complejos en medios redox más oxidantes y sus correspondientes quinonas los forman con rapidez.

También el ac. giberélico a concentraciones del mismo orden que las quinonas, produce un efecto similar con la fitohormona, aunque débil, pudiendo tratarse de otro tipo de interacción.

Se han estudiado los efectos de pH, polaridad y fuerza iónica, así como la posible competición con la Auxina de compuestos afines y derivados, en la formación de estos complejos. Aunque no se conozca su tipo de interacción intramolecular, su rapidez de formación sugiere la participación de la forma de semiquinona. La similitud del estudio realizado por J.E. Wilson sobre la naturaleza electrónica de los complejos Flavín/Indol y Flavín/Purina, nos revela su complejidad que hace necesaria una gran precisión para determinar los pequeños desplazamientos de las bandas de absorción.

La Fitohormona irradiada con luz U.V. requiere la presencia de riboflavina como receptor de fotones para catalizar su fotooxidación mediante un mecanismo de radicales libres y por ello originando analogos productos que la reacción enzimática.

Ya que la degradación oxidativa de la Fitohormona se realiza por un mecanismo de radicales libres no es de extrañar que la NBromosuccinimi-

da, por su facilidad para formar radicales libres en determinadas condiciones, lleve a cabo la reacción rápidamente. Por ello, se utiliza este reactivo de forma selectiva para la ruptura de enlaces peptídicos por oxidación de indoles β -sustituídos.

En todas estas reacciones se ha puesto de manifiesto el papel de los compuestos antioxidantes y los espectros de los productos de reacción.

El complejo Quinona/Auxina formado con pirogalol, se destruye mediante la acción enzimática de los extractos de raíces envejecidas de cebada, con una actividad HIA-oxidasa debilitada.

La liberación de la Fitohormona por la actividad enzimática - observada colorimetricamente - apreciada a pH 5,6 se hace más ostensible a pH 7,8, lo que demuestra la participación de la actividad peroxidásica en la destrucción del pirogalol con la misma fitohormona como sustrato peroxigénico.

Conclusiones

1º Desigual tolerancia de la Fitohormona por el tallo (10^{-4} M) y por la raíz (10^{-5} M) en la plantula de cebada.

2º El ácido Ferúlico y la Vanillina presentan en la germinación visible acciones inhibitoras más fuertes que el ac. Vanillinico y más acentuadas en la avena que en la cebada.

3º Los extractos crudos de raíces frescas de estos cereales contienen el sistema enzimático responsable de la degradación oxidativa de la auxina pero con muy distintas actividades, ya que mientras los de la cebada la muestran claramente, los de avena requieren la destrucción o eliminación de los inhibidores.

4º Los tratamientos realizados con este fin desactivan el sistema enzimático AIA-oxidasa por carencia de cofactores funcionales y la adición de extractos de cebada hervidos restaura la actividad y demuestra la existencia de cofactores termoestables.

5º Los extractos crudos de raíces de estos cereales, con distinta concentración de compuestos fenólicos, tienen apoenzimas con características similares y en presencia de ac. pHK e iones Mn^{2+} se restaura completamente la actividad del sistema enzimático.

6º Entre los activadores metálicos, los iones Mn^{2+} tienen un efecto muy superior a los iones Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} presentando los iones Cu^{2+} un gran efecto inhibitor.

7º El pH óptimo del sistema AIA-oxidasa se encuentra en el intervalo de pHs 3,5 - 5,6 y nosotros operamos a pH 5,6 por coordinación con

los medios de germinación utilizados.

8º Los cofactores exógenos - Fenol, ac. pH₄C, ac. Vanillinico, m-Hi
droxifenol - con efecto positivo muestran un grupo OH libre.

9º Entre los efectores - compuestos que modifican la actividad sin
que sean componentes esenciales del complejo enzimático funcional - he
mos distinguido dos grandes grupos:

I Efectores positivos, con alguna acción sinergetida en determina
das concentraciones, como el ac. p-Hidroxibenzoico.

II Efectores negativos, que por su modo de acción separamos en:

IIa Inhibidores de radicales libres, como los compuestos polifen
licos capaces de formación de quinonas.

IIb Inhibidores netamente competitivos, entre los que se encuen
tran los compuestos fenólicos con grupos funcionales similares a los
cofactores y poseedores de estructuras con probables impedimentos es
tericos que pueden competir con el cofactor nativo e incluso con el
sustrato, como el ac. Ferúlico.

Los todos estos compuestos deben tener como mínimo un grupo OH libre
sobre un anillo aromático y en posición orto o para respecto a otro
grupo.

10º La Cumarina por formación de lactona y el ácido Salicílico por
el efecto orto, enmascarando el grupo OH, no exhiben actividad.

11º El potencial redox del medio ejerce una gran acción en cual
quier actividad oxidásica y los compuestos muy reductores producen ac.
ciones inhibitoras al poder destruir los peróxidos.

12º El balance de los efectores positivos y negativos es importante,

y el propio extracto natural de avena que no muestra actividad, se hace activo por adición de ac. p-Hidroxicinámico.

13º En el extracto enzimático dializado, se apracia con claridad el efecto inhibidor del Mn^{2+} , sugiriendó ya alguna participación peroxidásica en la destrucción de la Fitohormona.

14º El enzima específico responsable de la degradación de la auxina en los cereales no ha sido aislado; sin embargo se va evidendiando la participación de las oxidasas conocidas.

15º El fraccionamiento del extracto enzimático por cromatografía en columna de Sephadex G-50 separa la parte proteica - apoenzima - y los demás cofactores y pone de manifiesto la adsorción de los compuestos fenólicos por el tratamiento con carbón activo.

16º En la posterior purificación del apoenzima mediante cromatografía en columna de Sephadex G-200, se puede apreciar el paralelismo entre las actividades AIA-oxidasa y peroxidásica de las fracciones eluidas. Sin embargo la AIA-oxidasa difiere de la peroxidásica en presentar un periodo de inducción.

17º Las grandes diferencias observadas en el comportamiento de los sistemas enzimáticos de las raíces de cebada y de avena tienen su confirmación al analizar la naturaleza y concentración de los compuestos presentes en sus extractos.

La avena tiene mayor cantidad de compuestos fluorescentes entre los que la Escopoletina ha sido aislada y caracterizada por sus espectros ultravioleta e infrarrojo.

Al mismo tiempo se separaron otros compuestos fluorescentes con Rf's

definidos y sus espectros nos dieron información sobre la posible naturaleza de sus estructuras (benzoica, cumarínica o cinámica).

El β -sitosterol es el principal componente esteroídico.

18º La Escopoletina aislada de las raíces de la avena puede actuar como cofactor del sistema en presencia de Mn^{2+} como activador.

19º Los extractos de las raíces de cebada y avena presentan actividades peróxidasicas del mismo orden, aunque tengan distinta evolución; pero sus actividades catalasicas son muy diferentes, siendo mucho mayor para los extractos de raíz de avena.

20 º La participación de la actividad catalasica puede ser aditiva cuando se opera con altas concentraciones de un monofenol o maleicohidrazida como cofactores, en presencia de Mn^{2+} a concentraciones superiores a $5 \cdot 10^{-4}$ M.

21º El sistema AIA-oxidasa de las raíces de los cereales muestra especificidad casi absoluta, ya que ninguno de los compuestos probados con estructuras relacionadas - Indol, Metil-Indol, ac. Indol-3-propiónico, Indol-3-acetamida, etc - presentan actividad.

La Indol-3-acetamida puede ser la forma potencial de la Fitohormona, regulando su liberación algún sistema del tipo de la Asparaginasa.

22º En el estudio cinético del sistema AIA-oxidasa directamente en las raíces troceadas, se observa la destrucción de la Fitohormona en función del oxígeno consumido y su consiguiente relación.

En el sistema enzimático purificado cromatográficamente la cinética de la reacción estudiada mediante técnicas espectrofotométricas

diferenciales, nos muestra que la velocidad de reacción $v = \frac{\Delta c}{\Delta t}$ - expresada por la variación de la concentración de la Fitohormona en función del tiempo - para el intervalo, de concentraciones $2,8 \cdot 10^{-3}$ M a $0,142 \cdot 10^{-3}$ M, aumenta con la concentración.

23º La Fitohormona irradiada con luz U.V. requiere la presencia de Riboflavina como fotoreceptor para catalizar la fotooxidación de la Auxina mediante el mecanismo de radicales libres y por ello originando analogos productos que la reacción enzimática.

La NBrsuccinimida, por su facilidad para formar radicales libres en determinadas condiciones destruye la Fitohormona rapidísimamente.

En todas estas reacciones, la necesidad absoluta de O_2 se pone de manifiesto al considerar el papel de los compuestos antioxidantes y sus productos de reacción.

24º La interacción Quinona/Auxina se aprecia claramente en los compuestos polifenólicos capaces de formar quinona, para concentraciones $5 \cdot 10^{-3}$ M. Estos compuestos mantienen la misma capacidad de interacción con formación de complejos en medios redox más oxidantes y sus correspondientes quinonas los forman con rapidez.

25º También el ac. Giberélico a concentraciones del mismo orden que las quinonas produce un efecto similar con la Fitohormona, aunque más débil, pudiendo tratarse de otro tipo de interacción.

26º El complejo Pirogalol/Auxina se puede destruir paulatinamente mediante la acción enzimática de los extractos de raíces de cebada envejecidas, con una actividad HIA-oxidasa debilitada.

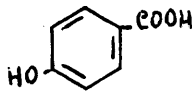
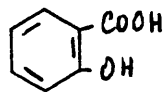
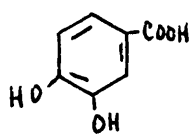
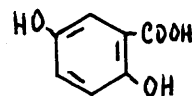
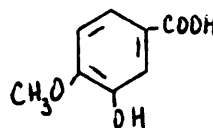
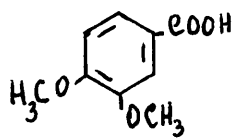
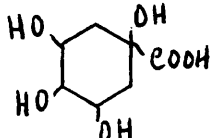
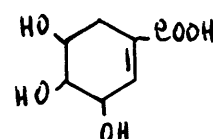
La liberación de la Fitohormona - observada colorimetricamente - mediante la actividad enzimática de los extractos, apreciada a pH 5,6

se hace más ostensible a pH 6,8 y 7,8 lo que demuestra la participación de la actividad peroxidasica en la destrucción del Pirogalol, con la misma Fitohormona como sustrato peroxigénico.

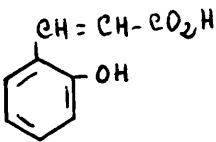
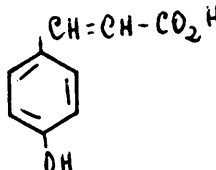
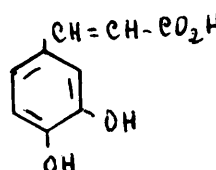
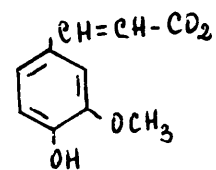
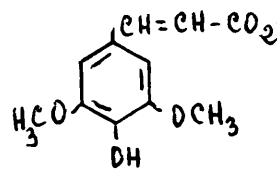
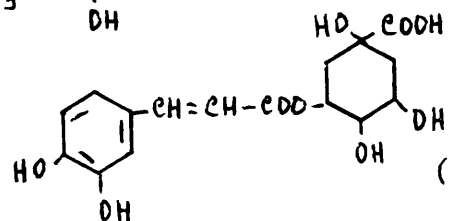
ABREVIATURAS

A continuación se expone una relación de los compuestos más directamente ligados con el trabajo y sus abreviaturas más comunmente utilizadas por nosotros.

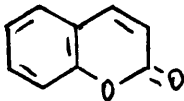
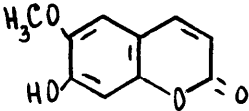
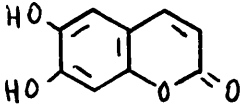
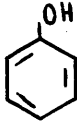
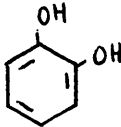
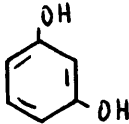

Acidos fenólicos de tipo benzoico

Formula	Nombre	Abreviatura	max. u.u.
	p-hidroxibenzoico	pHB	253, 280
	o-hidroxibenzoico (salicilico)	Sal.	235, 302
	3,4 dihidroxibenzoico (protocatequico).	Prot.	258, 293
	2,5 dihidroxibenzoico (gentisico)	Gent.	237, 332
	3 metoxi, 4hidroxibenzoico (vanillinico)	U	259, 289
	3,4 dimetoxibenzoico (verátrico)	ver.	257, 288
	1,3,4,5 tetrahidroxi exanoico (quinico)	Quin.	
	3,4,5, trihidroxixenoico (siquinico)	Siquin.	272

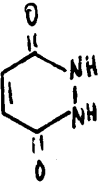

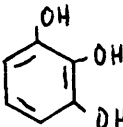
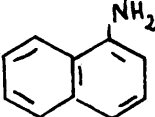
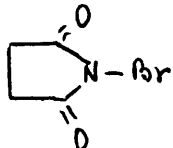
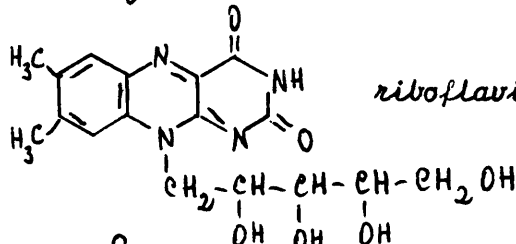
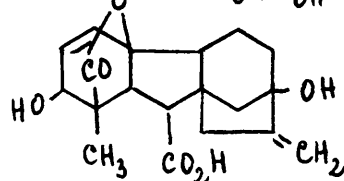
Compuestos de tipo cinámico. Ácidos.

Formula	Nombre	Abreviatura	max. U.V.
	o-hidroxicinámico (o-cumárico)	oHC	272, 322
	p-hidroxicinámico (p-cumárico)	pHC	288(s), 308
	3,4 dihidroxicinámico (cafeico)	Caf.	
	3 metoxi 4 hidroxici- námico (ferúlico)	Fer.	237, 288(s) 318
	3,5 dimetoxi 4 hidroxici- námico (sinápico)	Sinap.	
	(clorogénico)	Clorg.	

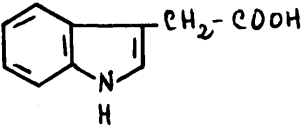
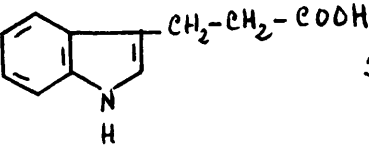
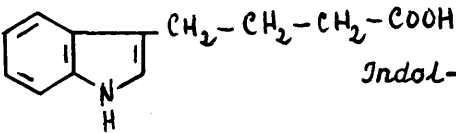
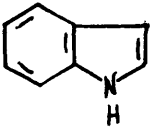
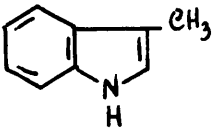
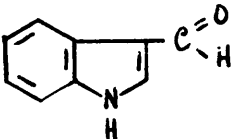
Cumarinas

Formula	Nombre	Abreviatura	max. U.U.
	cumarina	Cum.	275, 310
	escopoletina	Escop.	230, 255, 295, 345
	aesculetina	Aesc.	225, 255, 300, 345
	fenol	F.	
	1,2 hidroxifenol (pirocatequina)	oHF	275
	1,3 hidroxifenol (resorcina)	mHF	
	1,4 hidroxifenol (hidroquinona)	pHF	

Compuestos de tipo diverso

Formula	Nombre	Abreviatura
	maleicohidrazida	MH
	1,4 dehidroquinona (p-benzoquinona)	pBQ
	1,2,3 trihidroxibenceno (pirogalol)	P
	-naftilamina	NA
	NBrsuccinimida	NBrS
	riboflavina	Rb
	ac. giberélico	GA ₃

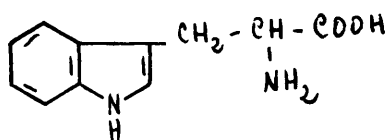
Derivados y afines del ac. Indol-3-acético

Formula	Nombre	Abreviatura
	Indol-3-acético	AIA
	Indol-3-propiónico	AIP
	Indol-3-butirico	AIB
	Indol	I
	Metil-3-indol	MI
	Indol-3-aldehido	I-3-Ald.

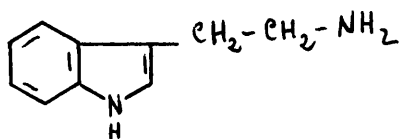
formula

nome

Abbreviatura

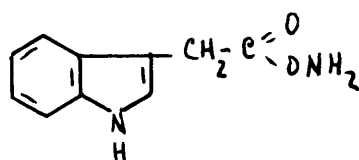


-Indolalanina
(triptofano)



Indol-3-etanolamina
(triptamina)

1-NH₂



Indol-3-acetamida

acet.

BIBLIOGRAFIJA

- 1 Gortner, W.A. y Kent, M.J.: *J. Biol. Chem.* 233, 731 (1958)
- 2 Ray, P.M.: *Arch. Biochem. and Biophys.* 96, 199 (1962)
- 3 Pilet, P.E.: *C.R. Acad. Sc. Paris*, 257 2322 (1963)
- 4 Hinman, R.L. y Lang, J.: *Biochem.*, 4, 144 (1965)
- 5 Raymond Fox, L. y col.: *Biochem.* 4, 2754 (1965)
- 6 Galston, A.W.: *Plant Growth Regulation*, 124. Iowa State University.
Press. Ames. (1961)
- 7 Engelsman, G. : *Nature*, 202, 88 (1964)
- 8 Sequeira, L. y Mineo, L.: *Plant Physiol.* 41, 1200 (1966)
- 9 Jacobson, B.S.: *Plant Physiol.* 42, 578 (1967)
- 10 Garcia Bilbao, J.L.: *Revista de Ciencia Aplicada* 109, 132 (1966)
- 11 Wilden, R. y Eriksson, K.E.: *J. Chromatog.* 15, 429 (1964)
- 12 Goodwin, R.H. y Pollock, B.M.: *Am. J. Bot.* 41, 516 (1954)
- 13 Mendiola, L. y Akazawa, T: *Biochemistry* 3, 174 (1964)
- 14 Garcia Bilbao, J.L.: *Cerveza y Malta* 11, 7 (1966)
- 15 Pilet, P.E. y Gaspar, Th.: *Monographies de Physiologie Vegetale*.
Masson. CIE Paris. (1968)
- 16 Risluk, R.L.: *Bioch. Biophys. Acta* 40, 531 (1960)
- 17 Ota, S. y Stein, W.H.: *Biochemistry* 3, 180 (1964)
- 18 Wilson, J.E.: *Biochemistry* 5, 1351 (1966)
- 19 Fukuyama, T.T. y Moyed, H.S.: *J. Biol. Chem.* 239 2392 (1964)
- 20 Patchornik, A. Lawson, W.B. y Witkop, B.: *J. Am. Chem. Soc.* 80, 17
4749 (1958)

- 21 Colowick, S.P. y Kaplan, N.O.: *Methods in Enzymology*. Acad. Press.
(1955)
- 22 Garcia Bilbao, J.L. y Gomez-Cordovés, M.C.: *Rev. Cerveza y Malta*
17, 23 (1968)
- 23 Garcia Bilbao, J.L., Gomez-Cordovés, C. y Hernandez, T.: *Cerveza y*
Malta 22, 7 (1969)
- 24 Garcia Bilbao, J.L. Gomez-Cordovés, C. y Hernandez, T.: *Cerveza y*
Malta 23, 7 (1969)
- 25 Garcia Bilbao, J.L., Gomez-Cordovés, C. y Hernandez, T.: *Cerveza y*
Malta 25, 15 (1970)